



Phénotypage de la réparation de l'ADN de lignées Xeroderma pigmentosum, par un test in vitro multiparamétrique

Anne-Laure Raffin

► To cite this version:

Anne-Laure Raffin. Phénotypage de la réparation de l'ADN de lignées Xeroderma pigmentosum, par un test in vitro multiparamétrique. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00411748

HAL Id: tel-00411748

<https://theses.hal.science/tel-00411748>

Submitted on 28 Aug 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée par

Anne-Laure RAFFIN

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble I

Ecole doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Biotechnologies

Phénotypage de la réparation de l'ADN de lignées Xeroderma pigmentosum,
par un test *in vitro* multiparamétrique

Directrice de thèse : Dr. Sylvie SAUVAIGO

Soutenue publiquement le 5 Juin 2009

Jury :

Dr. Odile DAMOUR, Groupe Hospitalier Edouard Herriot, Lyon (Rapporteur)

Dr. Murat SAPARBAEV, Institut Gustave Roussy, Villejuif (Rapporteur)

Pr. Alain SARASIN, Institut Gustave Roussy, Villejuif (Examineur)

Pr. Joël LUNARDI, CHU-Grenoble, Grenoble (Président)

Dr. Sylvie SAUVAIGO, CEA, Grenoble (Directrice de thèse)

Thèse préparée au sein du laboratoire Lésions des Acides Nucléiques

CEA Grenoble/INAC/SCIB/LAN

Remerciements

Je tiens à remercier mes deux rapporteurs, Dr. Odile DAMOUR et Dr. Murat SAPARBAEV pour avoir accepté de juger ce travail et pour tous les commentaires qu'ils m'ont apportés.

J'adresse également mes remerciements aux Professeurs Alain SARASIN et Joël LUNARDI pour leur participation à mon jury de thèse.

Je remercie vivement ma directrice de thèse, Dr. Sylvie SAUVAIGO, pour m'avoir accueillie dans son équipe et accompagnée durant ces 3ans ½ de thèse. Merci pour sa grande disponibilité, sa persévérance et ses conseils avisés lors de la rédaction de ce manuscrit.

Mes remerciements s'adressent aussi au Dr. Thierry DOUKI, directeur du LAN, pour l'environnement de travail agréable qu'il a su créer. Je souhaite remercier ce dernier ainsi que Dr. Walid RACHIDI pour la relecture et les corrections faites à ce manuscrit.

Ce projet scientifique a fait appel à plusieurs collaborations de travail. Ainsi, je tiens à remercier le Dr. Denis Biard pour l'élaboration et la fourniture des cellules HeLa siRNA, ainsi que l'équipe du Pr. Alain SARASIN, en particulier Danièle PHAM pour l'envoi des cellules de patients XP. Les expériences de cycle cellulaire ont été réalisées à l'IRTSV (CEA Grenoble) et ont été possibles grâce à l'expertise, la disponibilité et l'efficacité de Véronique COLLIN-FAURE.

Mes remerciements à Didier, Serge et Jean-Luc pour avoir répondu à mes questions diverses et variées allant de la chimie des oligo, au cycle cellulaire, en passant par la résolution des déboires informatiques.

Au cours de ce projet, j'ai eu la chance d'encadrer deux stagiaires, Florence PIVARD et Sandrine BESSETTE. Je tiens à les remercier grandement pour leur travail et leur contribution à l'avancement du projet.

Je remercie sincèrement Zohra TERMACHE, assistante du service, pour avoir facilité le côté administratif du projet (missions, commandes...). Un grand bravo à son efficacité ainsi qu'à sa conscience professionnelle !

Qu'aurait été cette thèse sans l'équipe du labo jaune, avec le maître de ces lieux, Sylvain CAILLAT ? J'adresse mes chaleureux remerciements à tous ceux qui ont fait vivre ce labo et participé à son bon fonctionnement ainsi qu'à son rangement !!! Ainsi, merci à Sylvain, Cyrille, Violaine, Serge, Bénédicte, Anne-Sophie, Laure et Gwenaëlle.

J'ai passé également de longues heures en pièce culture. Je garderai un très bon souvenir des « après-midis ménage » avec mon binôme Stéphane, baignés dans les vapeurs d'éthanol, ainsi que des papotages hebdomadaires à la fontaine à azote liquide pour le plein des containers! Merci aussi à Francette et Jocelyne, pour la gestion des commandes liées à cette salle. Je tiens également à remercier ces deux personnes pour les précieux coups de mains lors de la préparation de culots cellulaires et pour la réalisation des western-blot.

En plus du labo jaune et de la salle de culture, j'ai aussi passé beaucoup de temps, en pièce 361. Merci à tous les colocataires (Florence, Jean, Cyrille, Bénédicte et Emmanuel) qui ont partagé ce bureau avec moi, durant ces 3 années ½. Je garderai un bon souvenir des « longues » discussions que nous avons pu avoir entre la lecture de deux publis ! Une pensée spéciale pour Stéphane, le plus assidu squatteur de ce bureau, j'espère qu'il trouvera enfin sa place définitive !

Les pauses café du LAN ont été de bons moments de détente et de convivialité. J'entends encore résonner les éclats de rire de Christine ainsi que les blagues du vendredi la plupart du temps menées par Didier.

Je tiens à remercier les thésards qui m'ont précédés en particulier Caroline pour son amitié et Jean-Francois, pour toutes ses explications concernant la réparation de l'ADN et les subtilités liées à la puce plasmide.

J'adresse également mes plus vifs encouragements aux thésards actuels du LAN : Anne avec qui j'ai liée une amitié...sportive (!), Viviana, Adeline, Laure, Christophe, Vanessa et Mélanie.

Je remercie ma famille, tout particulièrement mes parents pour leur soutien et leurs encouragements, mes grands-mères et ma soeur. Je tiens également à remercier mes futurs beaux-parents, Françoise et Claude pour leur accueil au sein de leur foyer pendant une grande partie de la rédaction de ce manuscrit.

Enfin, mes plus grands remerciements sont dédiés à Antoine, qui a largement contribué à la réussite de ce projet. Merci pour son soutien téléphonique quotidien et ses venues hebdomadaires à Grenoble. Merci d'avoir embelli ces trois années et demie...place maintenant à notre vie, inséparable !

Face à la roche,
Le ruisseau l'emporte toujours,
Non par la force,
Mais par la persévérance.

H. Jackson Brown

à Antoine,

Sommaire

Liste des Abréviations.....	13
Avant-propos.....	15
CHAPITRE I : Etude bibliographique.....	17
I. L'ADN, UNE MOLECULE FRAGILE ET REPAREE	19
A. LA MOLECULE D'ADN	19
B. LES LESIONS DE L'ADN	21
1. Les « petites » lésions de l'ADN	23
2. Les lésions volumineuses	24
3. Les cassures de chaîne.....	27
4. Les mésappariements de base	27
C. LES CONSEQUENCES CELLULAIRES DES LESIONS DE L'ADN.....	29
1. La réparation de l'ADN chez l'Homme	31
2. La mutagénèse et la cancérisation.....	33
3. L'apoptose	35
II. LA REPARATION DE L'ADN : DEUX MECANISMES D'EXCISION-RESYNTHESE (BER ET NER)	37
A. LA VISION CLASSIQUE DES MECANISMES DE REPARATION PAR EXCISION-RESYNTHESE	39
1. Réparation par excision de base : BER	39
2. Réparation par excision de nucléotides : NER	53
B. VOIES ALTERNATIVES.....	75
1. AP endonucléase et la voie NIR (Nucleotide Incision Repair).....	75
2. La glycosylase NEIL, enzyme alternative pour la réparation des adduits et pontages inter-brins....	77
3. Endonucléase V.....	79
C. INTERACTION ENTRE LES SYSTEMES DE REPARATION	79
1. Rôle des protéines XP dans la réparation des dommages oxydatifs.....	80
2. Rôle des protéines CS dans la réparation des dommages oxydatifs : couplage de la BER et de la transcription	81
III. LE XERODERMA PIGMENTOSUM.....	82
A. SIGNES CLINIQUES ET ORIGINES DE LA MALADIE	83
1. Description de la maladie.....	83
2. Les patients XP sont déficients pour la NER.....	89
3. Spécificités cliniques des différents groupes de complémentation.....	91
B. DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT	95
C. REVUE SUR XPA	96

1. Le gène XPA.....	96
2. La protéine XPA.....	96
3. Les différentes mutations dans le gène XPA	100
4. Le ou les rôle(s) de XPA	103
IV. METHODES POUR ETUDIER LA REPARATION DE L'ADN.....	111
A. TECHNIQUES D'IMAGERIE : REGARDER LA DISTRIBUTION DES PROTEINES DE REPARATION	111
B. TESTS <i>IN VIVO</i> : MESURE D'ACTIVITES DE REPARATION AU SEIN DE LA CELLULE.....	115
1. Le test UDS (<i>Unscheduled DNA Synthesis</i>).....	117
2. Le test HCR (<i>Host Cell Reactivation</i>).....	121
C. TESTS <i>IN VITRO</i> : MESURE D'ACTIVITE DE REPARATION EN DEHORS DE LA CELLULE	122
1. Du lysat cellulaire au système reconstitué de protéines purifiées	123
2. Utilisation de lysats cellulaires.....	123
3. Systèmes reconstitués avec des protéines purifiées.....	126
OBJECTIFS.....	129
CHAPITRE II : Résultats.....	135
Partie I Introduction.....	137
I. COMPARAISON DE NOTRE TEST AVEC LE TEST DE REFERENCE.....	139
II. LES CONTRAINTES DU TEST SUR LA PUCE PLASMIDE.....	140
III. DEFINITION ET ILLUSTRATION DES PARAMETRES MESURES SUR LA PUCE PLASMIDE	145
A. QUANTIFICATION DES SIGNAUX DE FLUORESCENCE	145
B. DEFINITION DU PHENOTYPE REPARATION	147
C. LE NIVEAU DE FLUORESCENCE DU PLASMIDE CONTROLE.....	147
IV. VARIABILITE DES INTENSITES DE FLUORESCENCE ENTRE LES EXPERIENCES	148
Partie II Etude préliminaire à partir du modèle HeLa siRNA.....	151
I. CARACTERISATION D'ACTIVITES DE REPARATION DE L'ADN AU NIVEAU BASAL....	155
II. CARACTERISATION D'ACTIVITES DE REPARATION DE L'ADN EN REPONSE A UN	
TRAITEMENT GENOTOXIQUE	159
A. SURVIE CELLULAIRE APRES UNE IRRADIATION UVB	159
B. ACTIVITE DE REPARATION DE L'ADN EN REPONSE A UNE IRRADIATION UV.....	161

Partie III Etude à partir de lignées de fibroblastes de patients XP.....165

I. CARACTERISATION D'ACTIVITES DE REPARATION DE L'ADN AU NIVEAU BASAL.... 167

A. CARACTERISATION DES LYSATS CELLULAIRES	167
B. MESURE D'ACTIVITES D'EXCISION-RESYNTHESE	169
1. <i>Excision-resynthèse d'un lysat nucléaire témoin</i>	169
2. <i>Caractérisation de phénotypes de réparation XPA et XPC</i>	179
3. <i>Profils de réparation obtenus à partir de cellules XPC^{-/-}, XPD^{-/-} et XPG^{-/-}</i>	187
4. <i>Caractérisation de phénotypes de réparation XP avec des extraits totaux</i>	189
C. EXCISION SEULE	193
1. <i>Activités d'excision d'un lysat nucléaire témoin : détermination des conditions de concentrations protéiques</i>	195
2. <i>Caractérisation de phénotypes d'excision XPA et XPC</i>	199

II. CARACTERISATION D'ACTIVITES DE REPARATION DE L'ADN EN REPONSE A UN TRAITEMENT GENOTOXIQUE 201

A. REPONSE A UNE IRRADIATION UVB	201
1. <i>Etudes préliminaires</i>	201
2. <i>Activité de réparation de l'ADN en réponse à une irradiation UV</i>	207
3. <i>Effet de la confluence des cellules au moment de l'irradiation</i>	211
B. REPONSE A UN TRAITEMENT OXYDANT	219
1. <i>Etude préliminaire</i>	221
2. <i>Excision-resynthèse en réponse à un traitement oxydant</i>	225

CHAPITRE III Discussion.....227

I. SPECIFICITES LIEES AUX MODELES CELLULAIRES UTILISES DANS CETTE ETUDE . 230

II. INTERACTION ENTRE LES SYSTEMES DE REPARATION BER ET NER..... 233

III. LE NIVEAU BASAL D'EXCISION-RESYNTHESE..... 241

IV. REPONSE A UNE IRRADIATION UVB..... 244

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....247

CHAPITRE IV Matériels et Méthodes.....253

I. PREPARATION DE L'ECHANTILLON 255

A. CULTURE CELLULAIRE.....	255
1. <i>Produits et matériels</i>	255
2. <i>Culture des HeLa siRNA</i>	255

3. Culture des fibroblastes	259
4. Détection des mycoplasmes	259
5. Congélation de cellules.....	261
B. REPOSE CELLULAIRE FACE A UN TRAITEMENT GENOTOXIQUE	261
1. Irradiation UVB.....	261
2. Traitement à la riboflavine photo-excitée	262
3. Test de cytotoxicité.....	263
4. Récolte des cellules après un traitement génotoxique en vue de préparer des culots de cellules....	263
II. EXPLOITATION DE L'ECHANTILLON.....	264
A. ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX	264
B. ETUDE DE LA REPARATION	264
1. Préparation des lysats cellulaires.....	264
2. Dosage de protéines.....	266
3. Caractérisation des lysats vis à vis de la présence de la protéine XPA.....	267
4. Test de mesure d'activités de réparation sur support miniaturisé	267
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	281

ANNEXES

Liste des abréviations

- 8-oxo : 7,8 dihydro-8-oxoguanine
- 6-4 PP : Pyrimidine (6-4) Pyrimidone
- A : Adénine
- ADN: acide désoxyribonucléique
- AP : Apurique ou Apyrimidique
- ARN: acide ribonucléique
- ARNm: ARN messenger
- ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*
- ATR: *Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*
- B[a]P: Benzo[a]Pyrène
- BAX: *BCL-2 associated X protein*
- BER: *Base Excision Repair*, Réparation par Excision de Base
- BSA: *Bovine Serum Albumin*, albumine de sérum de boeuf
- C: Cytosine
- Cdk : *Cycline dependent kinases*
- CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
- CPD: *Cyclobutane Pyrimidine Dimer*, Dimère Cyclobutane de Pyrimidine
- CS : *Cockayne Syndrome*, syndrome de Cockayne
- Da : Dalton
- DMSO: Diméthylsulfoxyde
- dNTP : Desoxynucléotides Triphosphate
- DR: *Direct Reversal*, Réversion Directe
- DTT: Dithiothreitol
- EBV : Epstein Barr Virus
- ER : Excision-Resynthèse
- ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
- et al. : *et alii*, et les autres
- FLIP : *Fluorescence Loss Induced by Photobleaching*, perte de fluorescence induite par photoblanchiment
- FRAP : *Fluorescence Recovery After Photobleaching*, retour de la fluorescence après photoblanchiment
- G : Guanine
- GFP : Green Fluorescent Protein
- GG-NER: *Global Genome-NER*, NER de l'ensemble du génome
- Gy : Gray
- Fapy: Formamidopyrimidine
- FEN1: Flap Endonuclease 1
- H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
- HAP: Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
- HAS: Haute Autorité de Santé
- HCR: *Host Cell Reactivation*, reactivation de plasmide lésé
- HEPES: acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic
- HR: *Homologous Recombinaison*, Recombinaison Homologue
- ie : *id est*, c'est-à-dire
- IGR: Institut Gustave Roussy
- IP: Iodure de Propidium
- JNK: c-Jun N-terminal Kinase

- kb: kilobase
- MEF : *Mouse Embryonic Fibroblasts*, fibroblastes embryonnaire de Souris
- MMR: *MisMatch Repair*, Réparation des Mésappariements
- MNNG: *N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine*
- MTT: 3-(4,5-diméthylthiaol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
- NA-AAF: *N-acetoxy-2-acetylaminofluorène*
- NER: *Nucleotide Excision Repair*, Réparation par Excision de Nucléotides
- NHEJ: *Non Homologous End-Joining*, Jointure des Extrémités Non-Homologues
- NIR : *Nucleotide Incision Repair*, réparation par incision de nucléotide
- NLS : *Nuclear Localization Sequence*, séquence de localisation nucléaire
- ODN : OligoDésoxyNucléotides
- PARP : Poly(ADP-Ribose)Polymerase
- PBS: *Phosphate Buffer Saline*
- PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
- PCR: *Polymerase Chain Reaction*, réaction de polymérisation en chaîne
- PMFS: phenylmethanesulphonylfluoride
- PUMA: *p53 upregulated modulator of apoptosis*
- RPA: *Replication Protein A*
- RFC: *Replication Factor C*
- RRS: *RNA Recovery Synthesis*, reprise de la synthèse d'ARN
- siRNA: *small interfering RNA*
- SV40: Simian Virus 40
- SVF: sérum de veau foetal
- T: Thymine
- TC-NER: *Transcription Coupled-NER*, NER couplée à la transcription
- TTD : Trichothiodystrophie
- UDS : *Unscheduled DNA Synthesis*, synthèse d'ADN non programmée
- UV: ultraviolet
- XP: Xeroderma Pigmentosum

Avant-propos

L'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) est la molécule support de l'information génétique. Elle subit en permanence des agressions, de diverses origines, qui modifient alors sa séquence et donc l'information pour laquelle elle code.

Les conséquences des lésions de l'ADN sont multiples pour l'Homme ; elles vont de l'évolution des espèces à l'apparition de cancers. Face à ces agressions de la molécule d'ADN, la cellule peut mettre en place plusieurs réponses. Une issue possible est la réparation de l'ADN, processus permettant la restauration de la séquence intacte de l'ADN. La réparation de l'ADN participe, ainsi, au maintien de l'intégrité du génome.

La réparation de l'ADN est ici, étudiée au moyen de tests *in vitro* miniaturisés, permettant la mesure précise et spécifique d'activités de réparation à partir de lysats cellulaires. Le projet porte sur la caractérisation de phénotypes de réparation de l'ADN de lignées déficientes, en utilisant ces tests *in vitro*, développés au sein du laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques.

Nous allons, dans un premier temps, introduire le projet, par la présentation des deux mécanismes de réparation, auxquels nous nous intéressons plus particulièrement dans cette étude. Une partie sur la maladie du Xeroderma pigmentosum, déficience dans une voie de réparation de l'ADN, permettra de comprendre les caractéristiques du modèle de l'étude. Enfin, nous aborderons les différentes méthodes permettant d'étudier la réparation de l'ADN, ce qui nous amènera à introduire la problématique du sujet.

Chapitre I

Etude bibliographique

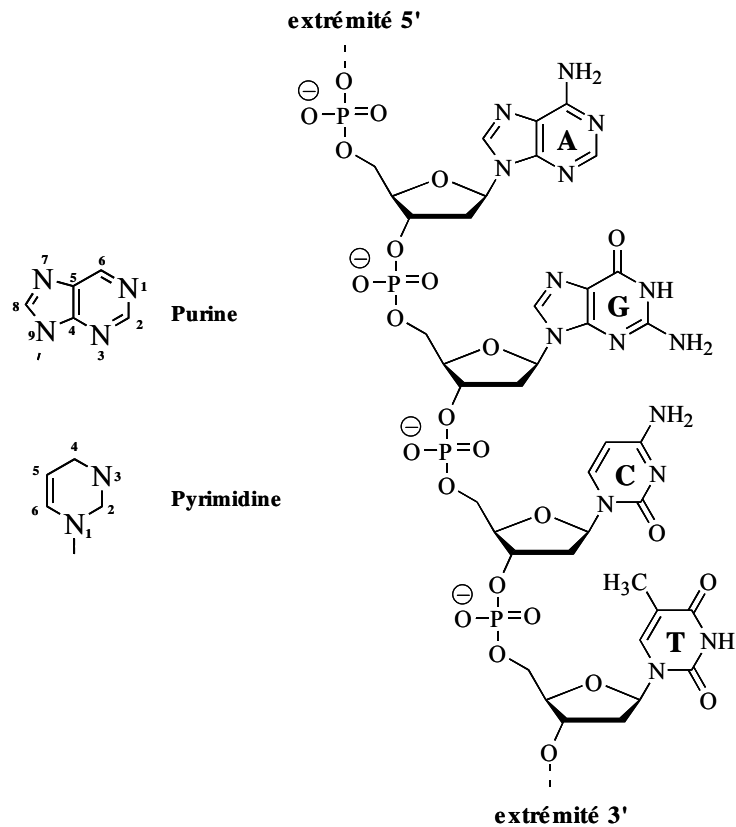


Figure 1: La structure des bases nucléiques puriques (A, G) et pyrimidiques (C, T) et de la chaîne désoxyribose-phosphate avec l'enchaînement de quatre nucléotides

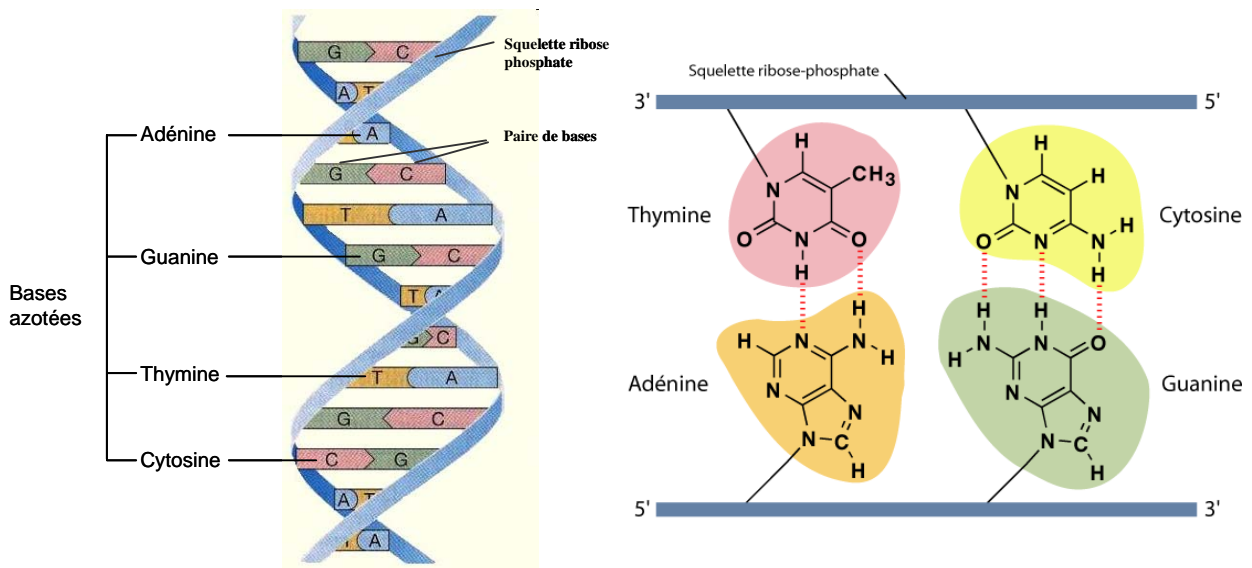


Figure 2: La double hélice d'ADN et les liaisons de Watson-Crick entre les paires de bases (appariement A-T , G-C)

I. L'ADN, une molécule fragile et réparée

A. La molécule d'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) fut isolé pour la première fois par le physicien Suisse, Friedrich Miescher, en 1869, grâce à la découverte d'une substance microscopique non protéique et non lipidique contenue dans du pus, retrouvé sur des bandages usagés qu'il nomme alors la nucléine (Dahm 2005). En 1919, Phoebus Levene identifie la structure du nucléotide à savoir une association d'une base azotée, d'un sucre et d'un groupement phosphate (Levene 1919). La **figure 1** présente l'enchaînement de quatre nucléotides. En 1953, des clichés de diffraction aux rayons X suggèrent une structure régulière hélicoïdale (Franklin *et al.*, 1953). La même année, s'appuyant sur ces observations, Francis Crick et James Watson (Watson *et al.*, 1953) proposent un modèle de structure en double hélice, antiparallèle, où les deux brins sont reliés par des liaisons hydrogène formées de façon spécifique entre deux bases azotées complémentaires Adénine-Thymine (A-T) ou Guanine-Cytosine (G-C) (**Figure 2**). Ils concluent également que l'hélice possède un diamètre uniforme de 2 nm et que les bases azotées sont empilées à des intervalles de 0,34 nm. A la fin des années 50, Meselson et Stahl démontrent que la réplication de l'ADN s'opère suivant un mode semi-conservatif (Meselson *et al.*, 1958), comme le suggérait le modèle de Watson et Crick. Lorsque la double hélice est répliquée, chaque molécule fille possède un brin ancien et un brin nouvellement synthétisé. La découverte de l'ADN constitue une avancée majeure pour la science.

L'ADN est une molécule contenant l'information nécessaire au développement et au fonctionnement de tous les organismes vivants. L'ADN assure deux fonctions fondamentales à la vie : la transmission de l'information génétique, permettant ainsi l'hérédité, et la synthèse des protéines, composants essentiels dans le fonctionnement de quasiment tous les processus biologiques. Chez les Eucaryotes, l'ADN est localisé dans le noyau et les mitochondries. Chez l'Homme, le polymère d'ADN une fois déroulé mesure jusqu'à 1 m 60 ; il est donc sous une forme extrêmement compactée dans la cellule. Dans le noyau, le polymère est présent sous forme de chromatine (**Figure 3**). Cette structure est rendue possible par les nucléosomes, complexes ADN-protéines dans lequel l'hélice d'ADN est enroulée autour d'une protéine constituée de sous-unités appelées Histones. Avant la division cellulaire, la chromatine se condense sous forme de chromosome. Durant cette étape, le compactage de l'ADN est maximal.

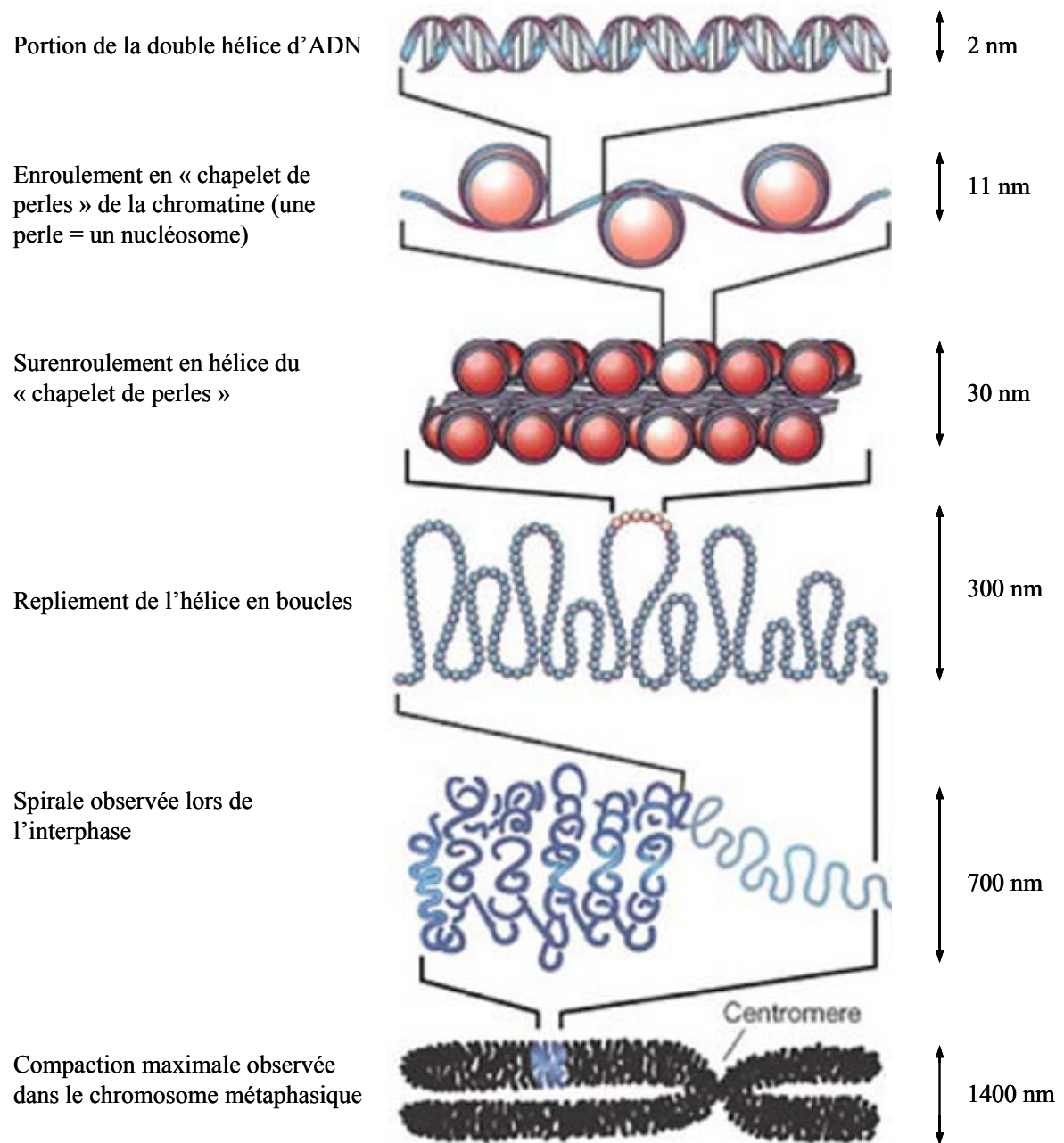


Figure 3: L'organisation chromatinienne de l'ADN

Le polymère d'ADN peut être endommagé selon plusieurs mécanismes, conduisant à l'apparition de lésions dans le génome. Les agents génotoxiques peuvent avoir des sources endogènes ou exogènes. L'origine endogène correspond aux réactions d'oxydation et d'hydrolyse, internes à l'organisme vivant et qui sont la conséquence directe de la vie en présence d'oxygène et d'eau. L'origine exogène inclut des agents physiques (radiations ionisantes, UV), chimiques (polluants, produits chimiques, médicaments) et biologiques (virus comme le papillomavirus).

L'apparition de lésions dans le génome est un phénomène continu. Il est estimé qu'il se produit environ 10 000 lésions par jour et par cellule (Friedberg *et al.*, 2006). Ainsi, une personne s'exposant en été sur une plage française à midi, reçoit en moyenne 15 à 20 J/cm² d'UVA par heure d'exposition. Cette exposition entraîne l'apparition d'environ 1,4 photoproduits pour 10⁶ bases et d'environ 0,1 8-oxoG pour 10⁶ bases (Mouret *et al.*, 2006). Les lésions de l'ADN peuvent avoir des conséquences néfastes puisqu'elles modifient l'information génétique.

Nous allons nous intéresser dans un premier temps à l'analyse des différents types de lésions de l'ADN et nous étudierons, par la suite, les conséquences de ces lésions pour l'organisme vivant.

B. Les lésions de l'ADN

Les différentes lésions présentées ci-après sont classées suivant la déformation de la double hélice qu'elles entraînent. Ainsi, les lésions sont regroupées artificiellement en fonction de leur taille dans les catégories « petites lésions » et « lésions volumineuses ». Les lésions de l'ADN, sont ainsi classées selon la déformation de la structure tridimensionnelle de la double hélice qu'elles entraînent. Ainsi, certains types de lésions sont plus déformants que d'autres, comme l'illustrent les températures de fusion d'oligonucléotides comportant des lésions. Par exemple, la température de fusion (T_m) d'un oligonucléotide dodécamère contenant une base oxydée (8-oxoG) chute de 2 °C (de 57 °C à 54,5 °C, dans des conditions salines de 100 mM NaCl) (Oka *et al.*, 2005). En revanche, la température de fusion d'un oligonucléotide dodécamère contenant un photoproduit (photoproduit 6-4 entre deux thymines) chute de 28 °C (de 49 °C à 21 °C, conditions salines de 1 M NaCl) (Jing *et al.*, 1998). Or, plus la température de fusion est basse, moins l'hybridation des deux brins est stable. Ainsi, les photoproduits déforment plus la double hélice que la 8-oxoG.

La **figure 4** schématise l'ensemble des lésions présentées dans cette partie.

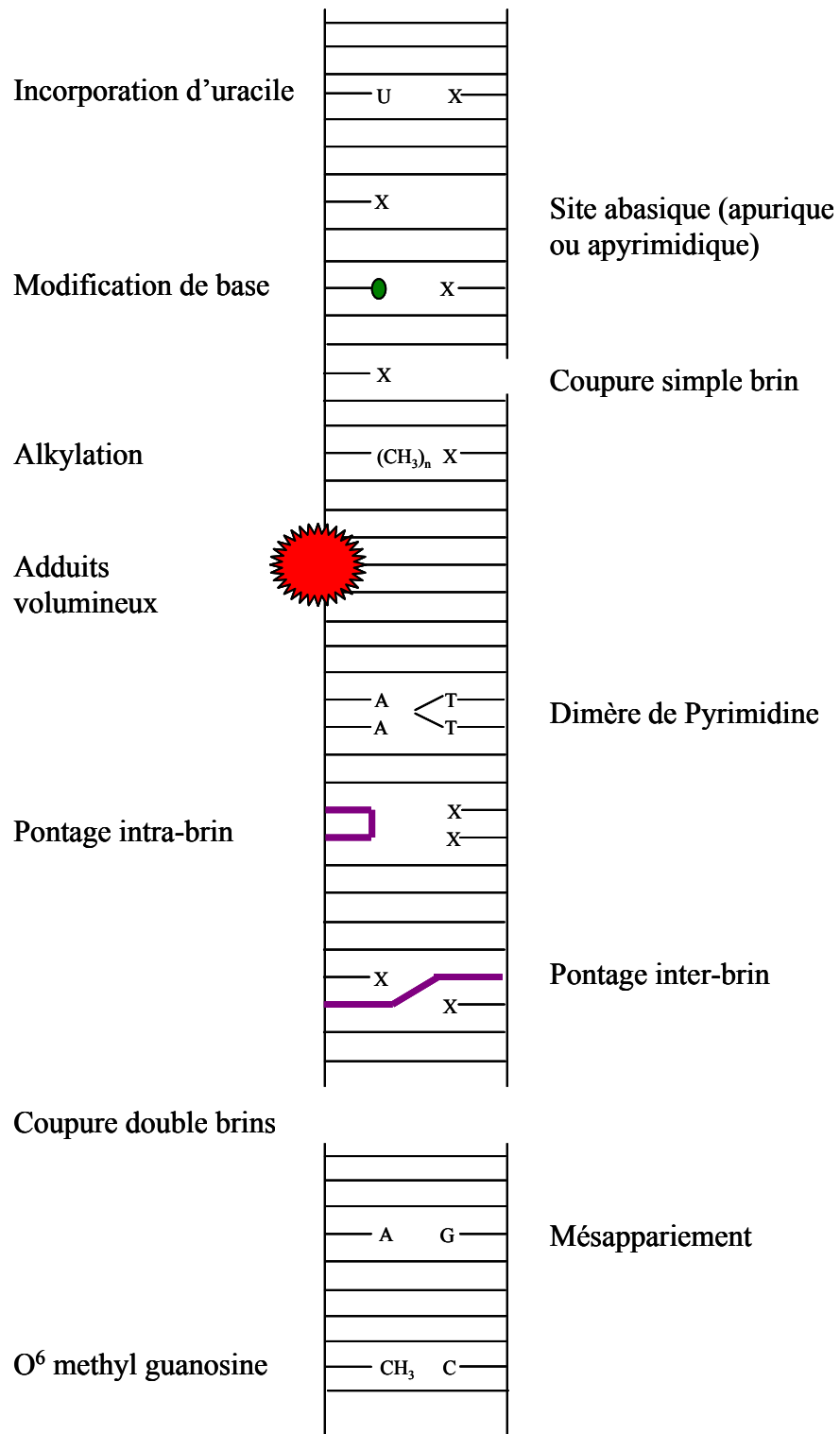


Figure 4: Les principaux types de lésions de l'ADN

1. Les « petites » lésions de l'ADN

Cette classe de lésions regroupe les dommages de l'ADN modifiant la structure chimique des composants de l'ADN mais n'altérant pas la structure de la double hélice au-delà du nucléotide concerné (lésion non déformante).

a) Les modifications de bases

Les bases azotées de l'ADN peuvent subir des modifications chimiques. Une modification très étudiée est l'oxydation des bases. Parmi celles-ci, la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) est le dommage oxydatif majoritairement formé dans l'ADN (Cadet *et al.*, 2003). Parmi les composants de l'ADN, la base guanine possède le plus faible potentiel d'ionisation ce qui explique pourquoi cette base est très souvent oxydée. Plusieurs mécanismes peuvent conduire à l'oxydation d'une base de l'ADN. Une première origine est endogène et liée au métabolisme cellulaire oxydatif. En effet, l'ADN réagit en permanence avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées par la respiration aérobie qui a lieu dans les mitochondries. Ces ERO sont très électrophiles et donc hautement réactives. Elles sont capables d'induire différents types de bases oxydées ; plus de 80 ont été identifiés sur des composés modèles. Les bases oxydées peuvent également se former par des processus exogènes, comme le rayonnement UVA ou le rayonnement ionisant qui conduisent à la production d'ERO. Par exemple, le rayonnement ionisant peut avoir une action indirecte lorsqu'il ne réagit pas directement avec l'ADN mais avec les molécules d'eau environnantes (radiolyse de l'eau). Cette réaction donne naissance notamment à des radicaux libres, comme $\cdot\text{OH}$, pouvant à leur tour réagir avec les bases de l'ADN conduisant à leur oxydation. Parmi les bases oxydées, les diols de thymine sont majoritaires.

Pour finir sur les modifications de bases n'altérant pas la structure tridimensionnelle de la double hélice, nous pouvons citer, l'ajout d'un groupement méthyle au niveau de la guanine, lors de la réaction du MNNG (*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) avec l'ADN. La lésion ainsi formée (O⁶-méthylguanine) correspond à une alkylation.

b) Les sites abasiques

Cette catégorie de lésion concerne la perte d'une base azotée, il ne reste plus que le sucre et la liaison phosphate. En effet, l'ADN peut perdre une base par un processus hydrolytique spontané, conduisant ainsi à la formation de sites abasiques. Toutes les bases (A, T, C et G) sont concernées. Les sites abasiques peuvent également provenir de l'oxydation du désoxyribose entraînant la perte de la base.

2. Les lésions volumineuses

Ce type de lésions regroupe les dommages de l'ADN modifiant à la fois la structure chimique des composants de l'ADN et la structure du polymère. Ces lésions volumineuses ont un impact sur l'organisation tridimensionnelle de l'ADN (dénaturation locale, courbure de la double hélice).

a) Les dimères de pyrimidine

Les rayonnements ultraviolets du soleil arrivent en permanence à la surface de la Terre. Ces rayonnements peuvent être divisés en 3 classes (A, B et C) suivant leur longueur d'onde (de 400 à 100 nm). Les UVA correspondent aux longueurs d'onde allant de 315 à 400 nm et représentent 95 % des ultraviolets solaires parvenant à la surface de la Terre. Les UVB correspondent aux longueurs d'onde allant de 280 à 315 nm et représentent 5 % des UV solaires parvenant à la surface de la Terre. Les UVC correspondent aux longueurs d'onde allant de 100 à 280 nm. Ce sont les ultraviolets les plus agressifs, mais ils sont absorbés totalement par la couche d'ozone.

Les photons UVB ne pénètrent pas les couches profondes de la peau, leurs effets sont donc relativement superficiels. Ils sont responsables des érythèmes, c'est-à-dire des réactions inflammatoires qui s'initialisent au niveau des cellules épidermiques (« coup de soleil »). Les UVA, en revanche, pénètrent jusqu'au derme et sont responsables des phénomènes de vieillissement de la peau. De plus, le rayonnement UV est maintenant bien reconnu comme étant à l'origine de la majorité des cancers cutanés (mélanome cutané malin et carcinomes) car ils induisent des lésions de l'ADN. En effet, l'absorption de l'ADN ayant un maximum à 260 nm et s'étalant jusqu'à 290-300 nm, le rayonnement UVB a un effet direct sur le biopolymère, à la différence des UVA qui eux agissent de façon indirecte sur l'ADN par la production d'ERO.

Lorsque l'ADN est exposé aux UV, il se forme notamment des photoproduits dont les plus fréquents impliquent des liaisons covalentes entre deux pyrimidines adjacentes (Cadet *et al.*, 2005; Courdavault *et al.*, 2005). Les dimères cyclobutane de pyrimidine (CPD) peuvent se former entre deux thymine adjacentes, entre deux cytosine ou entre une thymine et une cytosine. Cependant, les CPDs entre deux thymine sont les plus fréquents (environ 40%) après une irradiation UVB de peau ou de kératinocytes en culture (Mouret *et al.*, 2006). Pendant de nombreuses années, les UVA ont uniquement été associés à la formation de bases oxydées dans l'ADN. Cependant, une irradiation UVA de fibroblastes produit six fois plus de

CPDs que de 8-oxoG (Courdavault *et al.*, 2004a). En effet, les UVA conduisent à 80% à la formation de CPDs entre deux thymines.

Les radiations UVB peuvent également conduire à d'autres photoproduits comme les adduits pyrimidine(6-4)-pyrimidone, plus communément appelés photoproduits (6-4) (6-4 PP). Ces photoproduits concernent aussi deux pyrimidines adjacentes. Les photoproduits (6-4) apparaissent le plus souvent entre T et C. Une irradiation UVB de fibroblastes entraînent la formation de cinq fois plus de CPDs que de 6-4 PPs (Mouret *et al.*, 2008).

b) Les adduits

Cette classe de lésion correspond à l'addition d'une molécule, la plupart du temps exogène, au niveau d'une base azotée.

Il existe, cependant, une source endogène de formation d'adduit ; il s'agit de la peroxydation lipidique. Cette réaction d'oxydation des lipides présents dans la membrane des cellules conduit à la formation de produits de dégradation de type aldéhydique (4-Hydroxynonanal (HNE), trans,trans-2,4-Decadienal (DDE)) qui réagissent et s'additionnent aux bases puriques et pyrimidiques pour former des dommages de types bases alkylées (Moller *et al.*, 1998). Ces lésions constituent des adduits exocycliques, c'est-à-dire que l'addition de l'aldéhyde sur la base de l'ADN est suivie d'une cyclisation. Suivant la longueur de la chaîne alkyle additionnée, l'adduit formé est plus ou moins volumineux.

Les alkylations de bases peuvent également avoir une source exogène à cause de la réaction d'espèces chimiques. Par exemple, le chlorure de méthylène, très utilisé dans l'industrie pour ses propriétés de solvant puissant, est métabolisé par l'organisme par la glutathion transférase pour donner un composé actif pouvant s'additionner sur l'ADN (Watanabe *et al.*, 2007). L'adduit du Benzo[A]pyrène (B[a]P) est issu de la réaction des HAP (Hydrocarbure Aromatique Polycyclique) avec l'ADN. Le B[a]P est référencé dans la catégorie 1 de la réglementation du CIRC à cause de son pouvoir hautement cancérigène. Lorsque le B[a]P pénètre dans l'organisme il est métabolisé par diverses voies enzymatiques. Comme pour le chlorure de méthylène, ce sont les produits du métabolisme du B[a]P qui réagissent avec l'ADN et forme des adduits (Marie *et al.*, 2008).

Le cisplatine est un agent pontant qui va venir s'additionner sur une base de l'ADN (adduit) mais il peut aussi réaliser des liaisons covalentes intra ou inter-brins. Quant au

psoralène, cet agent intercalant peut être photoactivé par les UVA et former ainsi des adduits sur les pyrimidines conduisant à des pontages inter-brins.

3. Les cassures de chaîne

L'enchaînement des nucléotides peut être rompu conduisant à des cassures de la double hélice. Ces cassures peuvent survenir sur un seul brin (cassure simple brin) ou peuvent concerner les deux brins (cassures doubles brins). L'origine de ces cassures est diverse. En effet, les ERO peuvent être une source endogène de cassure de l'ADN. L'effet direct et indirect des radiations ionisantes peut également conduire à la rupture de la double hélice.

L'origine des expositions aux radiations ionisantes peut être naturelle (cosmique et tellurique) ou artificielle liée à l'activité humaine (exposition médicale, origine industrielle et militaire). Une irradiation de 1 Gy peut former jusqu'à 1000 cassures simples brins, 40 cassures doubles brins et de 1000 à 10 000 dommages de bases par cellule humaine (Joubert *et al.*, 2007). Enfin, des agents chimiques anti-tumoraux comme la bléomycine peuvent induire des cassures doubles brins de l'ADN.

4. Les mésappariements de base

Cette dernière catégorie de lésions concerne les erreurs d'appariement des bases de l'ADN comme par exemple une adénine en face d'une cytosine. Les mésappariements peuvent être la conséquence d'erreurs lors de la réplication (source endogène). En effet, les ADN polymérases répliquatives peuvent incorporer un nucléotide normal en face du nucléotide du brin matrice mais l'appariement est incorrect (exemple un A en face d'un C). Il peut aussi y avoir des délétions ou des insertions de nucléotides conduisant ainsi à un décalage dans l'appariement des bases.

A ce phénomène s'ajoute le fait que la cytosine possède la caractéristique de se désaminer spontanément, conduisant à la formation d'uracile. L'appariement des bases est alors modifié (mésappariement).

En conclusion, l'ADN peut donc être endommagé selon plusieurs mécanismes, conduisant à la formation d'un grand nombre de dommages différents. Les lésions décrites précédemment peuvent se présenter de façon isolée dans l'ADN mais il existe également des situations où plusieurs lésions sont regroupées dans une même partie du polymère. En effet, les lésions dites « multiples » apportent un niveau de complexité supplémentaire puisque dans ce cas là, deux ou plusieurs lésions sont formées à l'intérieur d'un ou deux tours de l'hélice d'ADN. Le

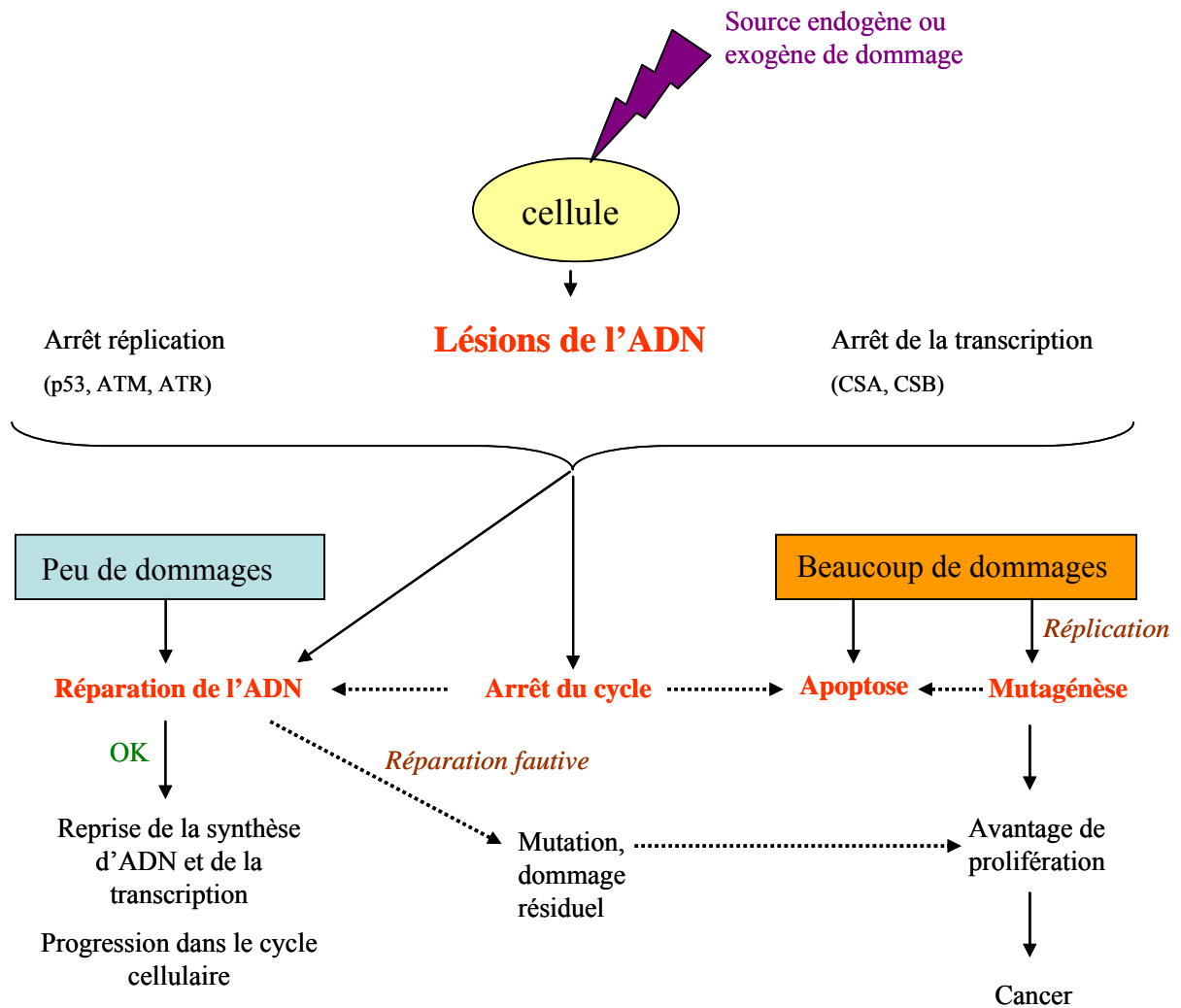


Figure 5: Les conséquences des lésions de l'ADN dans la cellule humaine

rayonnement ionisant conduit par exemple à la formation de plusieurs dommages (cassures doubles brins, oxydation de bases) au point d'impact du rayonnement avec l'ADN (Sutherland *et al.*, 2002).

Enfin, n'oublions pas que les sources de dommages présentées précédemment sont utilisées à des fins thérapeutiques dans le traitement des cancers. Par exemple, le rayonnement ionisant est utilisé en radiothérapie, le cisplatine intervient dans la composition de mélanges chimiothérapeutiques. En effet, les lésions de l'ADN engendrées par ces traitements anti-cancéreux conduiront notamment à une importante mutagénèse des cellules cancéreuses, résultant ainsi de leur mort.

Après avoir présenté les différents types de lésions de l'ADN, nous allons maintenant étudier comment la cellule réagit face à l'apparition de lésions dans le génome. En effet, les lésions de l'ADN ont un impact sur la vie cellulaire du fait de la modification de l'information génétique qu'elles entraînent. Nous allons voir que les lésions peuvent conduire à différentes réponses de la cellule.

C. Les conséquences cellulaires des lésions de l'ADN

Les différents dommages de l'ADN sont capables d'activer des points de contrôle (*checkpoint*) tout au long du cycle cellulaire. Les protéines Cdk (Cycline Dependent Kinases) sont les actrices de ces points de contrôle : grâce à leur action, la cellule ralentie ou arrête sa progression dans le cycle pour pouvoir répondre à l'agression subie par le génome. Les points de contrôle sont activés lorsqu'une lésion provoque un blocage de la réplication ou de la transcription. Etant donné la diversité des dommages, il est difficile de rationaliser le lien entre la nature du dommage et la fréquence des dommages, et l'activation d'un point de contrôle. Par exemple, les cassures doubles brins provoquent un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Lee *et al.*, 1998). L'activité de la protéine ATM augmente extrêmement rapidement après une irradiation ionisante ; ATM joue le rôle de senseur des cassures doubles brins. Les photoproduits sont eux repérés par ATR (Cimprich *et al.*, 2008). Ces senseurs activent ensuite des cascades de réactions où un grand nombre de facteurs interviennent. Plusieurs issues à ces cascades de réactions sont possibles selon la nature des dommages, leur fréquence, l'état physiologique de la cellule au moment de l'apparition du dommage (**Figure 5**). Tout d'abord, l'ADN peut être réparé par l'élimination du dommage pour retrouver une molécule d'ADN intacte. Un arrêt du cycle cellulaire est souvent nécessaire, pour que la cellule puisse réparer. La réparation de l'ADN fait intervenir plusieurs mécanismes décrits ci-dessous et peut être

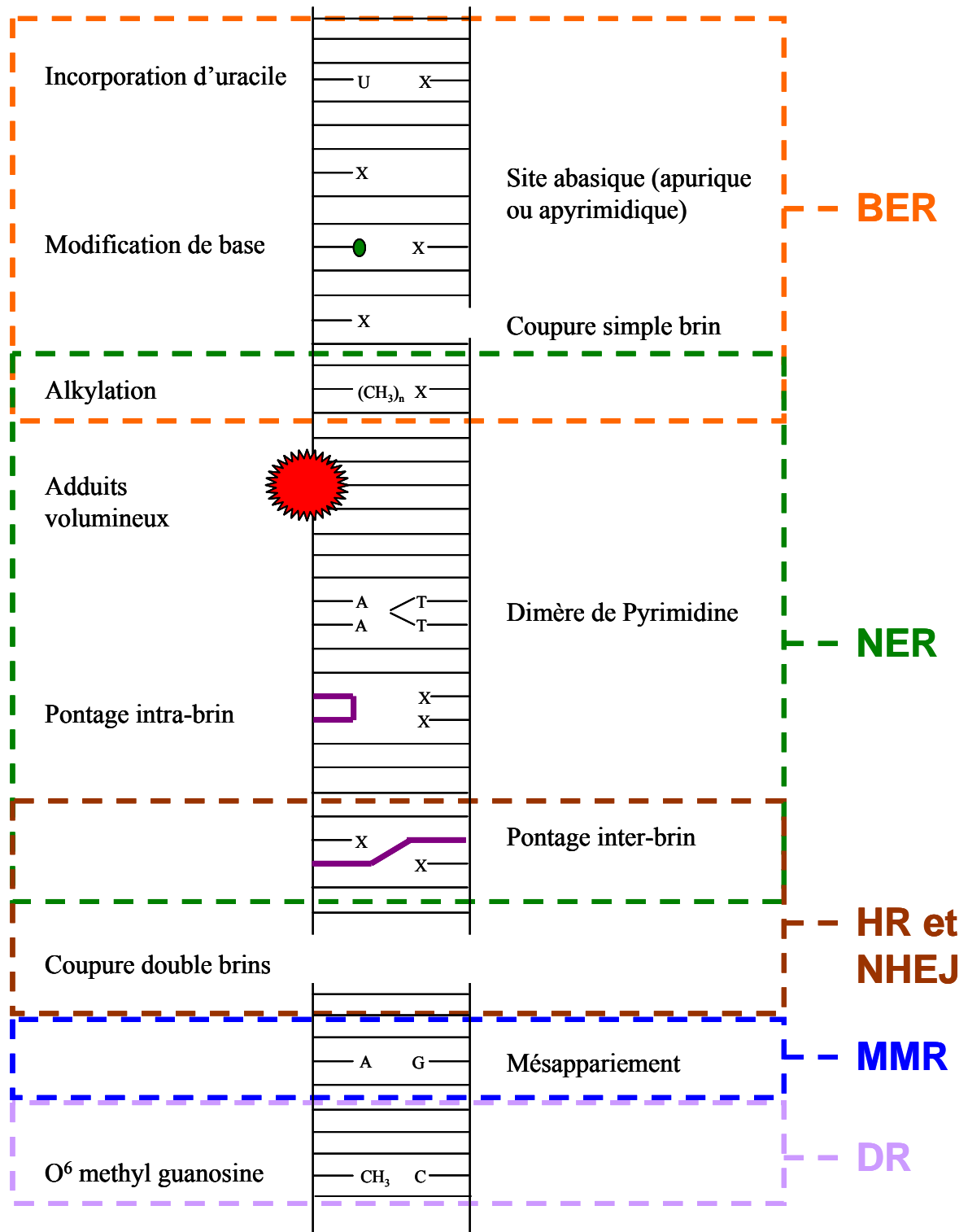


Figure 6: Les différents mécanismes de réparation de l'ADN chez les Mammifères

BER: Base Excision Repair, NER: Nucleotide Excision Repair, HR: Homologous Recombination, NHEJ: Non-Homologous End Joining, MMR: MisMatch Repair, DR: Direct Reversal

inductible ou non. L'ADN peut être mal réparé, c'est-à-dire que la lésion subsiste ou qu'une nouvelle lésion a été engendrée. Les lésions peuvent également échapper aux mécanismes de réparation. Ces lésions persistantes entraîneront des erreurs lors de la réplication de l'ADN pouvant alors conduire à l'apparition de mutations dans le génome. L'accumulation de ces mutations peut potentiellement entraîner des phénomènes de cancérisation. Enfin, si les dommages sont trop importants ou si la cellule est dépassée, elle choisira la voie de l'apoptose, processus définitif la conduisant vers la mort.

1. La réparation de l'ADN chez l'Homme

Il existe plusieurs mécanismes de réparation des lésions de l'ADN. Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser uniquement aux mécanismes de réparation existants chez les Mammifères (**Figure 6**). Chaque mécanisme prend en charge un ensemble de lésions de l'ADN aux caractéristiques communes, mais comme le montre la figure 6, des zones de recouvrement existent entre les différentes voies de réparation c'est-à-dire qu'un type de lésion peut être réparé par plusieurs mécanismes.

Chez l'Homme, les bases alkylées de l'ADN comme l'O⁶-méthylguanine peuvent être réparées par la réversion directe, les mésappariements de bases sont eux pris en charge par le système MMR (MisMatch Repair) et les cassures doubles brins sont réparées par recombinaison homologue (HR) ou par la recombinaison non homologue des extrémités (NHEJ). Ces systèmes de réparation ne seront pas plus détaillés dans ce manuscrit, nous nous intéresserons, par ailleurs, largement à deux mécanismes d'excision-resynthèse (BER et NER) puisque ce sont les voies de réparation étudiées lors des tests *in vitro*, présentés dans ce travail.

Les sites abasiques, les bases oxydées, les bases alkylées, l'uracile dans l'ADN, les cassures simples brins sont des lésions de l'ADN prises en charge par le système d'excision de base (BER). Ce système de réparation consiste en un processus multienzymatique où la base endommagée est excisée puis une étape de resynthèse de l'ADN permet de reformer une molécule exempte de dommage. Ce mécanisme sera détaillé par la suite dans la partie II.A.1.

Enfin, les adduits volumineux de l'ADN, les photoproduits ou les pontages intra et inter-brins sont, eux, réparés par le système d'excision de nucléotides (NER). Comme pour le système BER, le dommage est excisé puis il y a une resynthèse d'ADN. Un fragment de plusieurs nucléotides est, ici, excisé contrairement à ce qui se passe lors de la BER. Comme pour la BER, le mécanisme NER sera détaillé ultérieurement dans la partie II.A.2.

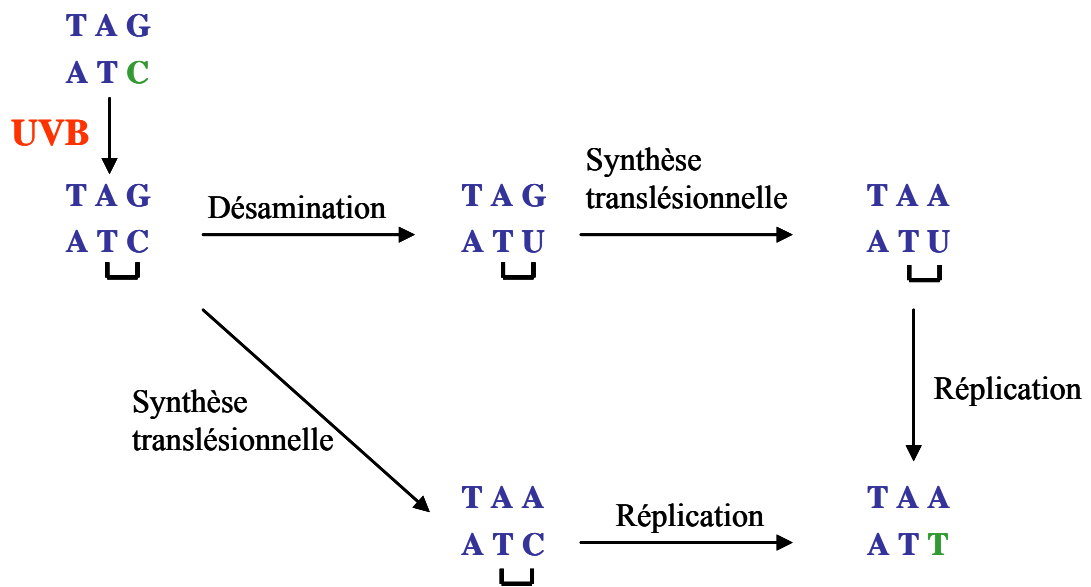


Figure 7: La formation de mutation après une irradiation UVB (transition C → T)

2. La mutagénèse et la cancérisation

La mutagenèse peut être une des conséquences de l'apparition de lésions de l'ADN dans l'organisme. Elle correspond à l'induction de mutations dans le génome et à la transmission de ces mutations à la descendance. L'information génétique est donc modifiée de façon stable et héréditaire. La réplication de l'ADN joue un rôle important dans la formation de mutations. En effet, les dommages de l'ADN peuvent entraîner une mauvaise reconnaissance de la séquence de l'ADN par les polymérases réplcatives. La machinerie enzymatique de la réplication de l'ADN est optimisée pour permettre une réplication rapide et fidèle, résultant, notamment, d'une reconnaissance spécifique des bases de l'ADN. Ceci a pour conséquence une faible capacité d'adaptation du système de reconnaissance des bases de l'ADN lorsque celles-ci sont modifiées et la possibilité de survenue de mésappariements. Ces mésappariements, s'ils ne sont pas réparés, entraînent l'apparition de mutations lors de la division cellulaire suivante. Il existe plusieurs types de mutations : les substitutions de bases, les délétions et les insertions de bases dans l'ADN. Les substitutions de base se classent suivant les mutations par transition et les mutations par transversion. Les transitions de base consistent en un changement de base tout en restant dans la même famille de la base azotée (purine ou pyrimidine), par exemple une transition d'une adénine vers une guanine. A l'inverse, les transversions sont le résultat d'un changement dans la famille de la base azotée, par exemple la transversion d'une adénine vers une thymine.

Prenons l'exemple des mutations engendrées après une irradiation UVB. 70% des mutations engendrées par les UVB sont des transitions C→T aux séquences TC (Pfeifer *et al.*, 2005) (**Figure 7**). Le CPD T◁C peut tout d'abord subir une désamination au niveau de la cytosine conduisant à une uracile à la place de la cytosine. Lors de la réplication, le CPD T◁U nouvellement formé ou le CPD T◁C qui n'a pas subi de désamination sont pris alors en charge par des polymérases particulières de la famille des polymérases translésionnelles (polymérases de la famille Y). Ces polymérases sont moins fidèles que les polymérases réplcatives classiques (α , δ et ϵ) pour pouvoir passer outre la lésion. La synthèse translésionnelle est un mécanisme fondamental puisqu'il permet à la cellule de ne pas être bloquée dans le cycle cellulaire. Néanmoins, la réplication par la synthèse translésionnelle est souvent fautive c'est-à-dire qu'un mauvais appariement de base est susceptible d'avoir lieu. Ainsi dans notre cas, la polymérase incorpore une adénine en face de la cytosine ou de l'uracile (ces bases au niveau d'un dimère codent comme un T). A la division cellulaire suivante, l'adénine faussement insérée est recopiée par la voie classique de réplication et

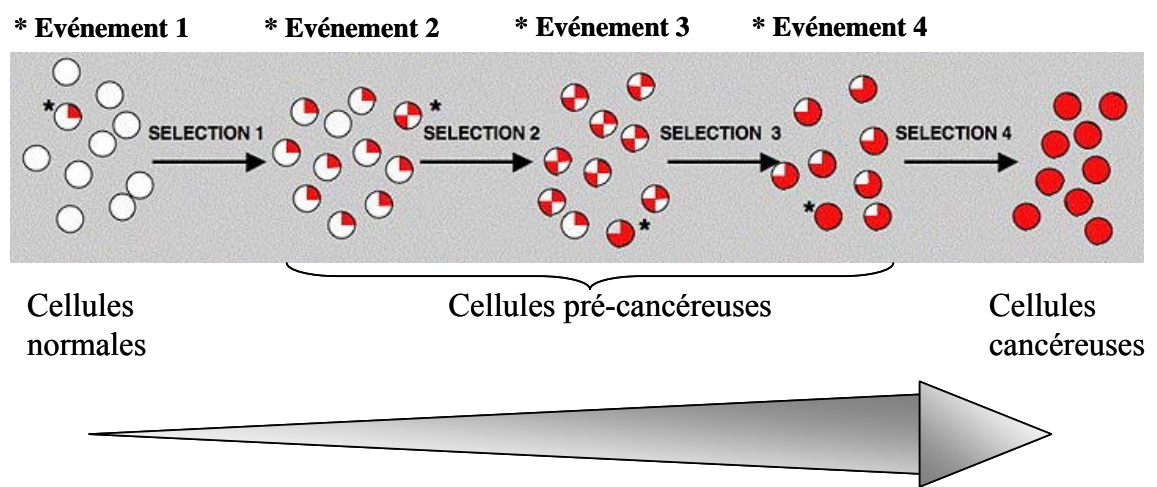


Figure 8: Le processus de cancérisation (modèle de Vogelstein)

donnera lieu à l'incorporation d'une thymine. Ainsi, il y a bien eu une transition d'une cytosine vers une thymine.

Les mutations peuvent avoir différents types de conséquences. La mutation est dite silencieuse lorsqu'elle n'entraîne pas de modification dans la séquence des acides aminés lors de la traduction. La mutation est dite faux-sens lorsqu'elle entraîne le codage d'un acide aminé différent, ce qui peut avoir des répercussions sur la fonction de la protéine. Enfin la mutation est dite non-sens lorsqu'elle fait apparaître un codon terminateur (STOP) qui entraîne la synthèse d'une protéine tronquée souvent inactive.

Une mutation peut potentiellement atteindre et modifier la séquence d'un gène codant pour un facteur jouant un rôle dans le contrôle de la multiplication cellulaire (oncogène ou gène suppresseur de tumeur). Dans ce cas, la cellule peut acquérir un avantage sélectif lui permettant de donner naissance à un premier clone de cellules anormales (lésion précancéreuse) (Fearon *et al.*, 1990) (**Figure 8**). Dans ces cellules qui ont un avantage sélectif, la probabilité qu'une seconde mutation apparaisse et soit sélectionnée est plus importante. Dans ce cas, une seconde population sera générée, plus anormale que la première et qui va se développer à ses dépens. Par diverses étapes successives, plusieurs mutations peuvent s'accumuler, chacune d'entre elles permettant la sélection d'un clone de plus en plus malin et finir par aboutir à une cellule hautement cancéreuse. La progression tumorale correspond donc à un processus dynamique qui, à chaque étape, sélectionne une nouvelle cellule ayant subi une ou plusieurs altérations. Un autre modèle pour expliquer le phénomène de cancérisation est l'apparition d'une mutation primaire dans un gène associé à la réparation de l'ADN ou dans celui d'une polymérase (Loeb *et al.*, 1974). La cellule présente alors un « phénotype mutateur », elle est capable d'engendrer un grand nombre de mutations.

Globalement, le processus de cancérisation nécessite des mutations dans plusieurs gènes afin d'obtenir une cellule transformée. Une cellule cancéreuse voit sa prolifération activée, elle ne régule plus son cycle cellulaire et elle échappe à l'apoptose.

3. L'apoptose

Quand l'ADN d'une cellule est trop endommagé et qu'elle ne peut le réparer, sa division s'arrête et elle peut alors mourir par apoptose. L'apoptose (ou mort cellulaire programmée, ou suicide cellulaire) est un processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. La nécrose, en revanche est une mort incontrôlée en réponse à une agression aiguë.

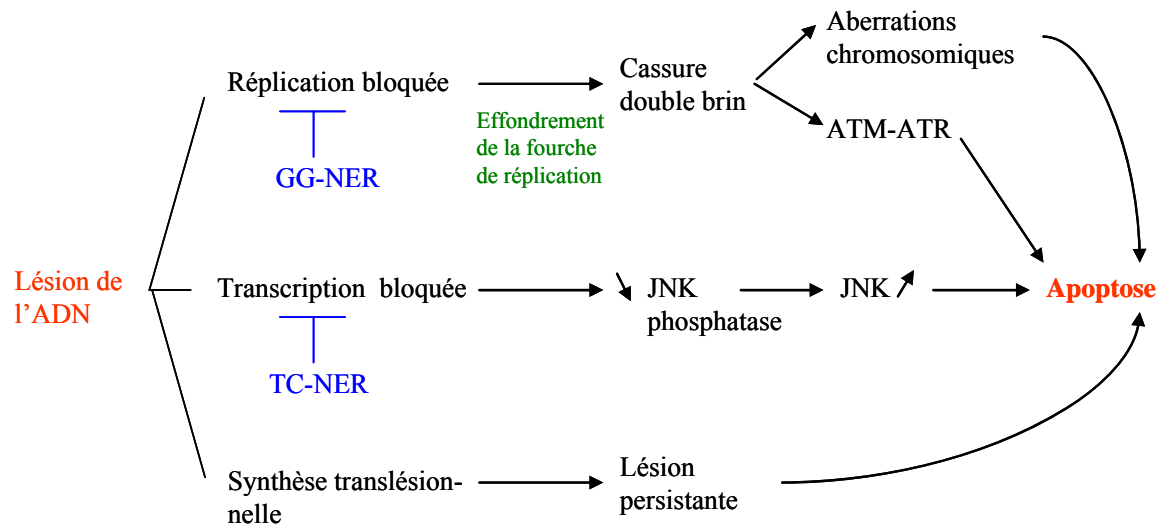


Figure 9: Les différentes voies conduisant à l'apoptose après l'apparition de lésions dans l'ADN. Adapté de (Roos *et al.*, 2006)

Les dommages de l'ADN conduisent préférentiellement à une mort par apoptose, par rapport à la nécrose ou à l'autophagie (Roos *et al.*, 2006). Des cellules HeLa transfectées avec un vecteur codant pour une photolyase d'un marsupial sont protégées de l'apoptose après une irradiation UV par rapport aux cellules non transfectées (Chigancas *et al.*, 2000). La photolyase permet la réparation spécifique des CPDs. Ainsi, la réparation des CPDs diminue la formation des cellules apoptotiques. Les cellules déficientes pour la NER sont hypersensibles aux UV ; ceci est dû en grande partie à l'induction de l'apoptose dans ces cellules (Dunkern *et al.*, 2001). La majorité des lésions ne va pas induire l'apoptose de façon directe. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les dommages de l'ADN peuvent bloquer la réplication (**Figure 9**) (Roos *et al.*, 2006). Cet arrêt de la fourche de réplication peut conduire à des cassures de la double hélice. Les cassures doubles brins sont des dommages conduisant majoritairement à l'apoptose en activant la voie de signalisation initiée par ATM. Les lésions peuvent également bloquer la transcription de l'ADN. Ceci peut avoir pour conséquence l'arrêt de l'expression du gène codant pour la JNK phosphatase. L'accumulation de JNK phosphorylée constitue un signal d'activation de la voie apoptotique. Enfin les lésions répliquées lors de la synthèse translésionnelle et conduisant à des adduits persistants peuvent également conduire à l'activation de la voie apoptotique. L'apoptose fait intervenir des voies de signalisation complexes, où de nombreuses protéines sont impliquées. p53 joue notamment un rôle très important puisqu'il semble orchestrer la balance entre l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (Millau *et al.*, 2008a). En effet, après l'activation par ATM, p53 régule l'activité de p21 ce qui a pour conséquence de bloquer le cycle cellulaire en G1-S (Roos *et al.*, 2006). Suivant la quantité de dommages, p53 va soit activer p21, soit activer directement des gènes pro-apoptotiques comme BAX, PUMA et le récepteur FAS. Le niveau d'activation de l'ensemble ATM-ATR-p53 semble donc être essentiel à la mise en place de l'apoptose.

II. La réparation de l'ADN : deux mécanismes d'excision-resynthèse (BER et NER)

Nous allons étudier, ici, plus en détail deux mécanismes de réparation : la réparation par excision de base (BER) et la réparation par excision de nucléotides (NER). Ces deux mécanismes suivent le même schéma. En effet, dans les deux cas, la lésion est dans un premier temps excisée, puis l'ADN est resynthétisé et ligaturé pour reformer une molécule intacte c'est-à-dire exempte de lésion et dont la séquence est identique à celle avant

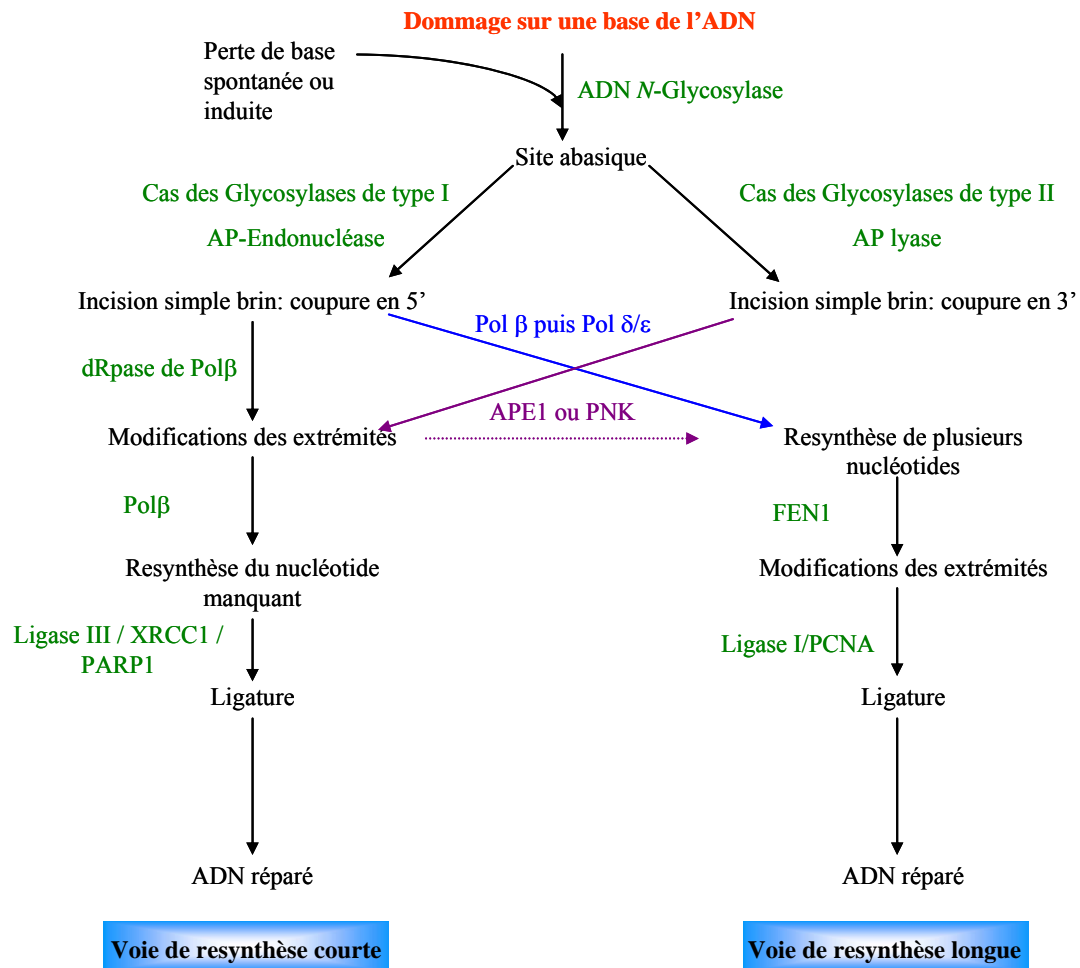


Figure 10: Les différentes étapes de la BER
Adapté de (Krokan *et al.*, 1997)

l'induction du dommage. Cependant, ces deux voies de réparation font intervenir des enzymes différentes et ne prennent pas en charge le même type de lésions.

Les dommages réparés par la BER sont des « petits dommages » c'est-à-dire peu volumineux. Pour rappel, cela concerne les sites abasiques, les cassures simple brin, les bases oxydées, les petites bases alkylées et l'uracile dans l'ADN (Christmann *et al.*, 2003). Ces dommages modifient la structure chimique de l'ADN mais ne déforment pratiquement pas la double hélice. Au contraire, la NER prend en charge les dommages qui modifient à la fois la structure chimique des composants de l'ADN et sa structure tridimensionnelle. Cela concerne les adduits volumineux, les pontages intra et inter-brin et les photoproduits.

A. La vision classique des mécanismes de réparation par excision-resynthèse

Nous allons étudier les deux mécanismes de réparation de l'ADN par excision-resynthèse. La description mécanistique réalisée dans les paragraphes 1. et 2. correspond à la vision classique des voies BER et NER largement étudiées dans la littérature. Nous verrons par la suite, dans les parties B et C, que cette vision classique peut être nuancée par l'existence de mécanismes alternatifs à ceux présentés ci-dessous et à l'existence d'interactions entre les systèmes de réparation.

1. Réparation par excision de base : BER

Le système BER a été élucidé pour la première fois en 1972 chez *E.coli* (Verly *et al.*, 1972). Cette voie de réparation a été mise en évidence après le système NER. La réparation par excision de base est présente chez les procaryotes et chez les eucaryotes. Aucune maladie liée directement à une déficience dans la BER n'a été à ce jour répertoriée (Hegde *et al.*, 2008). Le système BER a longtemps été considéré comme le système de réparation le plus simple ; nous allons voir ici que ce système est en fait assez complexe puisqu'il fait intervenir de nombreuses protéines ainsi que de nombreuses interactions protéine-protéine.

a) Déroulement

La réparation par excision de base est un processus multienzymatique et faisant intervenir une succession d'étapes (**Figure 10**).

Famille	Nom complet	Acronyme chez l'Homme	Acronyme Chez <i>E.coli</i>	Substrat	Activité AP lyase?
Uracile ADN glycosylase	Uracil DNA <i>N</i> - Glycosylase	UNG	Ung	Uracile	non
	Single-strand-selective Monofunctional Uracil- DNA Glycosylase 1	SMUG1	Ung	Uracile et 5- hydroxymethyluracil	non
	Methyl-CpG-Binding Domain 4	MBD4	?	Uracile, T en face O6 méthylguanine, T en face G (séquence CpG)	oui
	Thymine DNA <i>N</i> - Glycosylase	TDG	Mug	Uracile et T ou ethenocytosine en face G (séquence CpG)	non
Alkyl ADN glycosylase	Methyl Purine DNA Glycosylase	MPG	Tag, AlkA	3-méthylpurine, hypoxanthine, éthénoadénine	non
ADN glycosylase spécifique des mismatch en face d'un A	MutY Homolog	MUTYH	MutY	A en face de 8-oxoG, 2-OH-A en face de G	non
ADN glycosylase pour les bases oxydées	Endonuclease Three Homolog 1	NTH1	EndoIII	Thymine Glycol, 5- formylUracile	oui
	8-oxo-Guanine Glycosylase 1	OGG1	EndoIII	8-oxoG, Fapy-G	oui
	Nei-like mammalian DNA glycosylases 1	NEIL1	EndoVIII	Thymine Glycol, Fapy-A et Fapy-G, 5-OHU, 8-oxoG	oui
	Nei-like mammalian DNA glycosylases 2	NEIL2	Fpg	Hydantoine, 5-OHU	oui
	Nei-like mammalian DNA glycosylases 3	NEIL3	Fpg	?	?

Tableau 1 : Les différentes ADN *N*-glycosylases humaines

Adapté de (Friedberg *et al.*, 2006; Hegde *et al.*, 2008)

i. Reconnaissance du dommage et formation d'un site abasique

L'étape de reconnaissance de la base modifiée est réalisée par une ADN N-Glycosylase (Fortini *et al.*, 2003a; Almeida *et al.*, 2007; Hegde *et al.*, 2008). Après sa fixation sur la base lésée, l'ADN N-Glycosylase coupe la lésion N-glycosidique reliant la base au sucre ; il en résulte alors un site abasique (Krokan *et al.*, 1997). Face à la diversité des bases modifiées, la cellule a acquis un nombre important d'ADN N-Glycosylases, chacune spécifique d'un dommage ou d'un groupe de dommages. Cette stratégie permet d'avoir une reconnaissance très fine et précise des modifications de la structure chimique de l'ADN, parfois minimes. La reconnaissance joue sur la conformation spatiale bien particulière des ADN N-Glycosylases. En effet, la plupart d'entre elles partagent une conformation tridimensionnelle très proche bien qu'ayant des séquences peptidiques totalement différentes. Elles ont aussi en commun un domaine de fixation à l'ADN de type hélice-boucle-hélice (Doherty *et al.*, 1996). Ces similarités ont permis de les regrouper dans la superfamille des ADN N-Glycosylases. Ces enzymes sont des protéines monomériques de poids moléculaires relativement faibles (entre 20 et 50 kDa) (Fortini *et al.*, 2003a; Hegde *et al.*, 2008). Les glycosylases reconnaissent généralement des bases anormales (bases oxydées, uracile dans l'ADN). Il existe cependant des exceptions pour les glycosylases MUTYH, TDG et MBD4 qui reconnaissent, par exemple, de façon très spécifique une adénine normale en face d'une 8-oxoG. Le **tableau 1** ci-contre présente les ADN N-Glycosylases humaines ainsi que les bases modifiées qu'elles peuvent reconnaître et exciser. La structure de l'ADN joue aussi un rôle dans la spécificité des enzymes. Ainsi, il a été montré que la 8-oxoG pouvait être également, le substrat de NEIL1 (Morland *et al.*, 2002; Parsons *et al.*, 2005). Les activités des enzymes NEIL, identifiées bien plus tardivement que OGG1 et NTH1 (en 2002) semblent dépendantes de la structure de l'ADN au moment de la reconnaissance du dommage. En effet, alors que OGG1 et NTH1 reconnaissent des bases modifiées contenues dans de l'ADN double brin (duplex), les enzymes NEIL reconnaissent plus particulièrement les lésions contenues dans de l'ADN simple brin par exemple au niveau de bulles (lors de la transcription) ou de fourches (lors de la réplication) dans la structure de l'ADN (Dou *et al.*, 2003).

Il est à noter que certaines glycosylases présentent aussi une activité AP lyase, en plus de leur activité N-Glycosylase, permettant d'inciser l'ADN après la formation du site abasique. Nous allons le voir, cette activité AP lyase a une importance sur le déroulement de la suite du mécanisme de réparation.

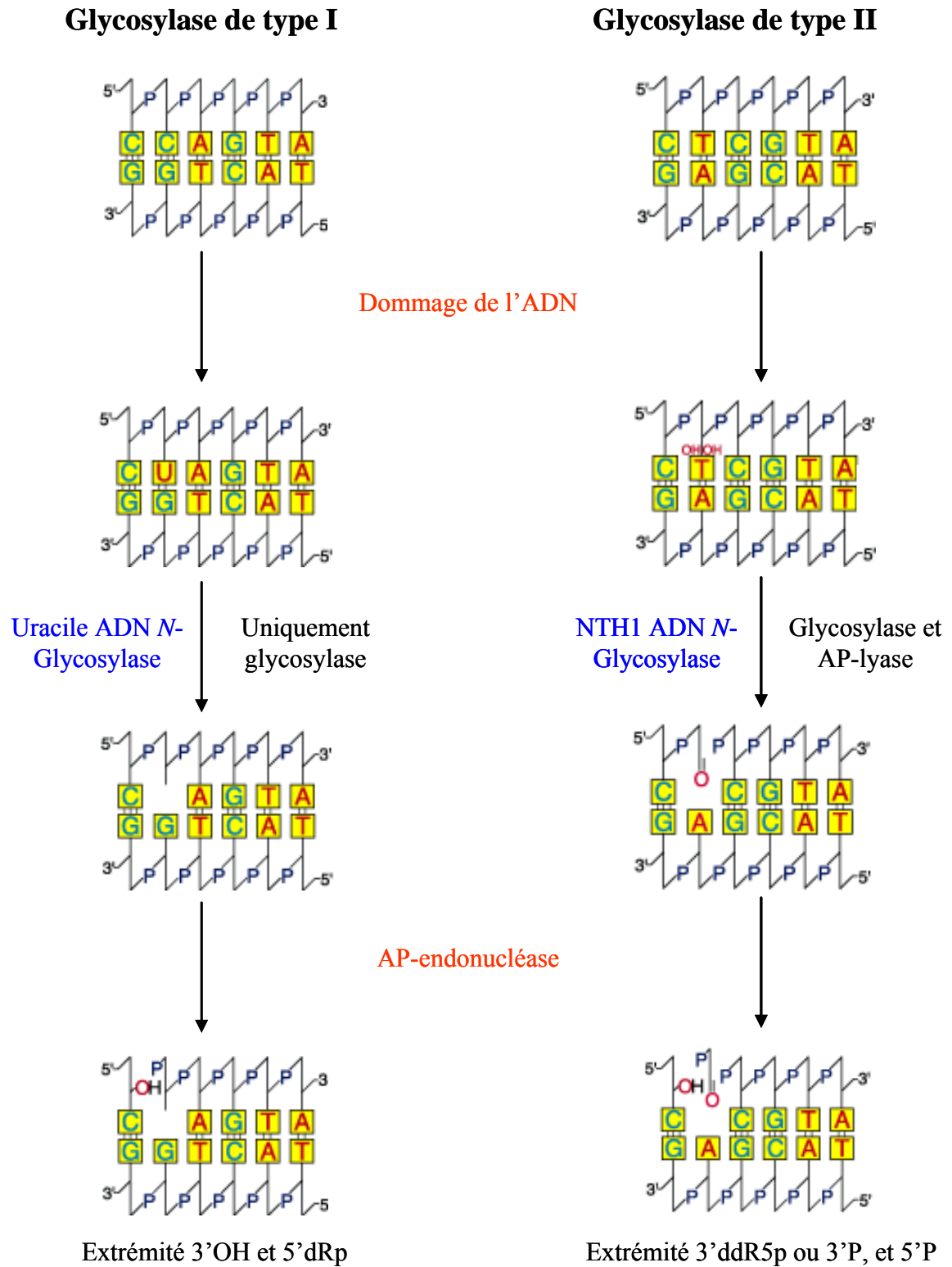


Figure 11: Les activités Glycosylases et AP-Endonucléases (cas des Glycosylases de type I et II)

ii. Incision du brin d'ADN

Une fois le site abasique formé par l'ADN N-Glycosylase, une incision dans le brin d'ADN doit avoir lieu afin de permettre la resynthèse de la base éliminée. Cette incision peut être réalisée selon deux mécanismes distincts, soit par une AP-Endonucléase (cas des glycosylases monofonctionnelles de type I), soit par une glycosylase bifonctionnelle (type II).

- Incision réalisée par les AP-Endonucléases (cas des Glycosylases de type I) :

Cette incision peut tout d'abord être réalisée par une famille de protéines appelée AP-Endonucléase (APurinique ou APyrimidique Endonucléase). Ces enzymes ont la capacité de reconnaître les sites abasiques et d'hydrolyser la liaison phosphodiester en 5' (entre le groupement phosphate et le désoxyribose du nucléotide précédent) provoquant ainsi une cassure simple brin de la double hélice. Il en résulte une extrémité 3'OH et une extrémité 5'dRp (5' désoxyribose phosphate) (**Figure 11**). L'extrémité 3'OH servira d'amorce lors de la resynthèse par les ADN polymérases alors que l'extrémité 5'dRp sera enlevée par une ADN désoxyribosephosphodiesterase ou la Flap endonucléase 1 (FEN-1). La Pol β possède également cette activité 5' dRpase. D'autres polymérases (iota ι et lambda λ) possèdent aussi cette activité mais Pol β semble être la principale actrice de cette fonction dRpase (Bebenek *et al.*, 2001; Garcia-Diaz *et al.*, 2001). Les interactions protéine-protéine semblent jouer un rôle important dans le fonctionnement des glycosylases monofonctionnelles (Wilson *et al.*, 2007). Par exemple, l'interaction entre l'enzyme TDG et l'APE1 semble améliorer l'efficacité d'excision de la glycosylase.

Les AP-Endonucléases ont été découvertes en premier chez *E. coli* (Xth, Nfo). Ces enzymes ont été ensuite identifiées chez les Levures, le Nématode et les Mammifères. Un orthologue de Xth a été identifié chez les Mammifères et nommé APE1 (Demple *et al.*, 1991). Un second orthologue de Xth a ensuite été cloné et nommé APE2. Cependant, le rôle de APE2 dans le système BER semble très négligeable (Hegde *et al.*, 2008). L'activité de APE1 est dépendante de cations divalents notamment en Mg^{2+} . Le magnésium affecte à la fois l'interaction avec l'ADN et la coupure de la liaison phosphodiester (Masuda *et al.*, 1998).

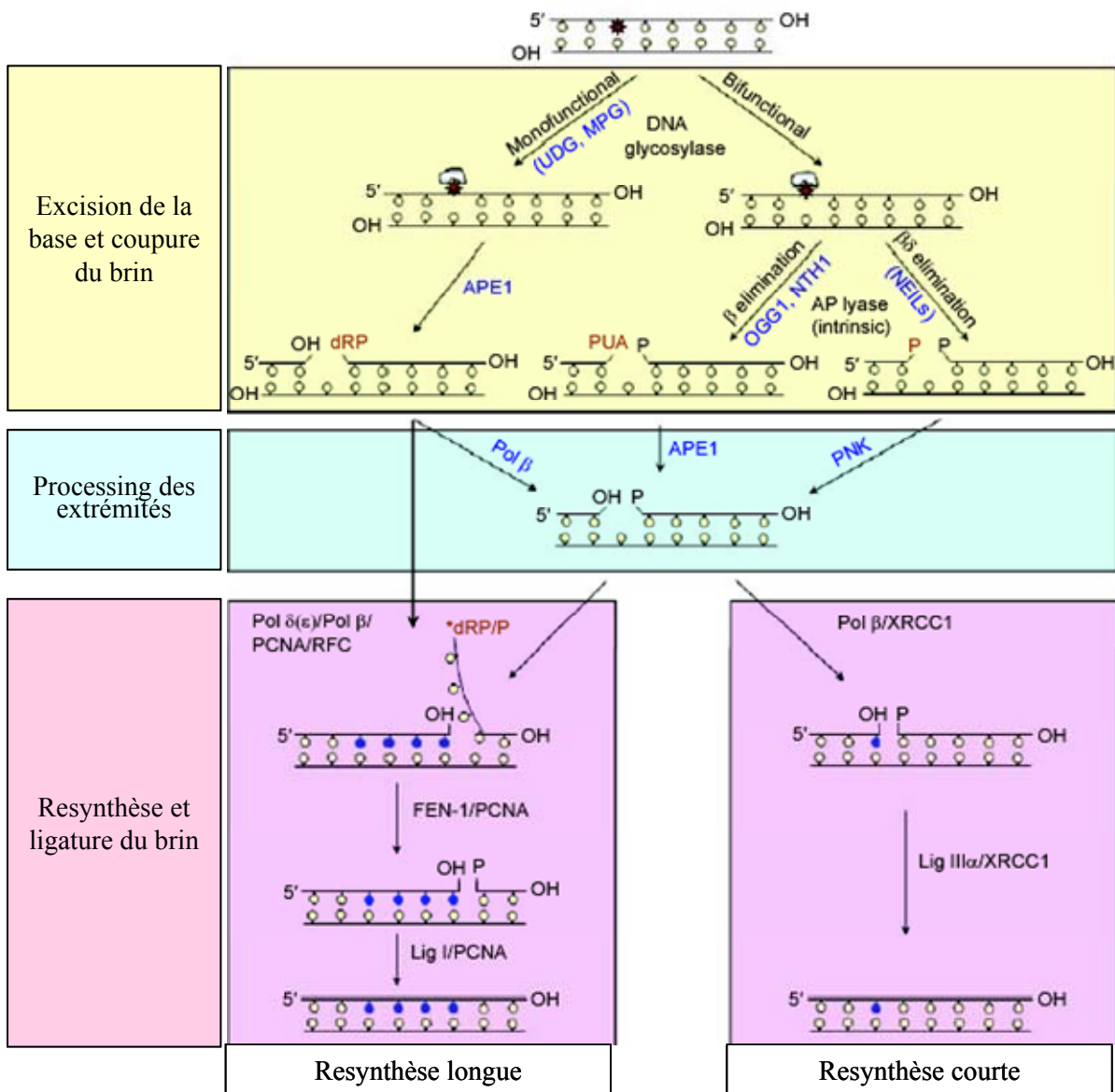


Figure 12: Les différentes étapes de la BER: les différentes coupures possibles et les extrémités associées. Adapté de (Hegde *et al.*, 2008)

- Incision réalisée par Glycosylases AP lyases (cas des Glycosylases de type II)

L'étape d'incision peut aussi être réalisée par les ADN *N*-Glycosylases ayant une activité AP lyase. Grâce à cette activité AP lyase, elles sont capables d'hydrolyser la liaison phosphodiester en 3' (entre le groupement phosphate et le désoxyribose du nucléotide suivant) du site abasique par un mécanisme de β (OGG1, NTH1) ou $\beta\delta$ (NEIL) élimination. Théoriquement, cette double activité (glycosylase et lyase) permettrait de diminuer le temps de réparation, puisque dans ce cas précis le recrutement d'une AP endonucléase n'est pas nécessaire. Cependant, il existe des exceptions à cette règle : la coupure réalisée par OGG1 est paradoxalement très lente. La constante catalytique (k_{cat}) de cette enzyme est de $0,1 \text{ min}^{-1}$ (Hill *et al.*, 2001), alors que comparativement, elle est de $0,9 \text{ min}^{-1}$ pour la TDG, enzyme monofonctionnelle (Waters *et al.*, 1998).

Dans le cas d'une β élimination, il en résulte une extrémité 5'P et une extrémité 3' aldéhydique insaturée α,β , 4-hydroxy-2-pental (ddR5p), et une extrémité 5'P et une extrémité 3'P dans le cas d'une $\beta\delta$ élimination (Hegde *et al.*, 2008) (**Figures 11 et 12**). Ces extrémités 3' doivent subir un réarrangement pour que la resynthèse puisse avoir lieu. Une phosphodiesterase réalise cette hydrolyse, permettant la formation d'un 3'OH nécessaire pour l'élongation du brin d'ADN. L'APE1 possède cette activité 3' phosphodiesterase et s'occupe ainsi de couper l'extrémité 3'ddR5p engendrée par les Glycosylases de type II fonctionnant par une β élimination (Hegde *et al.*, 2008). Dans le cas des enzymes NEIL, l'extrémité 3' est prise en charge par une polynucléotide kinase (PNK) possédant à la fois une activité 5' kinase et une activité 3' phosphatase (Wiederhold *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2006).

Les deux activités (glycosylase et AP lyase) n'agissent pas de façon concomitante. En effet, des mesures d'activité et d'affinité de fixation de NTH1 sur la lésion diol de thymine montrent que l'activité 3' lyase est dépendante de l'affinité de fixation de l'enzyme au niveau du site abasique (Marenstein *et al.*, 2003). Lorsque l'activité de APE1 est activée, la fonction AP-lyase de NTH1 n'est plus utilisée, la cassure du brin se fait grâce à l'AP endonucléase. APE1 aurait donc un rôle « accélérateur ». Ainsi, dans les conditions physiologiques où APE1 est en condition non limitante, NTH1 fonctionnerait comme une glycosylase de type I. Cette observation a également été faite pour OGG1 et MUTYH.

iii. Resynthèse de la zone excisée

Deux voies de resynthèse sont possibles, et pour chacune d'entre elles le nombre de nucléotides incorporés diffère :

- La voie de resynthèse courte :

Durant cette voie de resynthèse, un à deux nucléotides sont incorporés par la polymérase β (Pol β) associée à XRCC1 (Figures 10 et 12). Cette voie est initiée après la coupure par une glycosylase de type I (associée à APE1) ou une glycosylase de type II. En même temps que les nucléotides sont polymérisés, la polymérase β , qui a aussi une activité ADN-désoxyribophosphodiesterase (dRpase), excise l'extrémité 5'dRp générée lors de la coupure par l'endonucléase (cas des glycosylases monofonctionnelle de type I). Rappelons que dans le cas des glycosylases bifonctionnelles, l'extrémité 3' a été modifiée avant la resynthèse grâce à une activité 3' phosphodiesterase (APE1 ou PNK).

- La voie de resynthèse longue :

Lors de la voie de resynthèse longue, un nombre plus important de nucléotides est incorporé, environ cinq à sept (Figures 10 et 12). Cette voie est initiée majoritairement après la coupure de la base modifiée par une ADN N-Glycosylase monofonctionnelle mais cette voie peut aussi être empruntée après la coupure par une glycosylase de type II (Fortini *et al.*, 2003b). Cette étape est réalisée par les mêmes polymérases que celles impliquées dans la resynthèse lors de la NER, à savoir : les polymérases δ ou ϵ associées au facteur de processivité PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et à RFC (Replication factor C). Les polymérases δ et ϵ n'ayant pas d'activité dRpase, les nucléotides qu'elles polymérisent provoquent une zone de recouvrement où l'ancien brin d'ADN n'est plus hybridé à son complémentaire. Une Flap endonucléase 1 (FEN1) grâce à son activité ADN-désoxyribophosphodiesterase va alors inciser ce fragment d'ADN pour donner une extrémité 5'P.

Des expériences réalisées avec des enzymes purifiées montrent que la voie de resynthèse longue peut aussi utiliser la Pol β (Prasad *et al.*, 2001). Pol β insère le premier nucléotide puis les polymérases ϵ et δ prennent le relais.

Certains résultats tendent à montrer que la sélection entre la voie de resynthèse longue et la voie courte serait guidée par la capacité à éliminer le résidu 5'dRp. Lorsque l'extrémité 5'dRp peut être enlevée rapidement par l'activité dRpase de Pol β , la voie courte est préférentiellement choisie (Matsumoto *et al.*, 1995). Au contraire, la voie longue semble

privilégiée lorsque l'extrémité 5'dRP n'est pas hydrolysée de façon efficace, par exemple lors de la réparation d'un site abasique oxydé par des ERO conduisant à la formation de produit d'oxydation du désoxyribose (Hegde *et al.*, 2008). Une autre hypothèse pour expliquer les deux types de voies de resynthèse repose sur la nature des ADN N-Glycosylases (mono ou bi-fonctionnelle) (Fortini *et al.*, 1999). En effet, l'hydrolyse de la lésion 8-oxoG par OGG1 contenue dans un lysat cellulaire humain conduit ensuite dans 75% des cas vers la resynthèse de la voie courte utilisant Pol β (Dianov *et al.*, 1998) alors qu'une incision par une glycosylase monofonctionnelle oriente ensuite préférentiellement la resynthèse vers la voie longue.

Pour finir, la voie de réparation par excision de base a lieu dans le noyau mais aussi dans les mitochondries ; cependant la voie de resynthèse longue serait limitée au noyau (Wilson *et al.*, 2007).

iv. *Ligature de l'ADN*

Cette étape finale de la BER fait intervenir différents acteurs en fonction de la voie de resynthèse qui a été empruntée (courte ou longue). Dans le cas de la voie courte, c'est le complexe ligase III / XRCC1 / PARP-1 qui referme la double hélice d'ADN, lors de la voie longue c'est le complexe ligase I / PCNA (Figures 10 et 12). Il est à noter que l'étape de ligature de la voie longue partage la même ligase que celle utilisée par la NER.

b) Cas des cassures simples brins

Dans le cas où l'ADN présente une cassure simple brin suite à l'action d'ERO ou de radiations ionisantes, l'action des glycosylases est inutile puisqu'il n'y a pas de base endommagée à enlever. Les protéines XRCC1 et PARP1 servent alors de senseurs de la cassure (Almeida *et al.*, 2007; Hegde *et al.*, 2008). Le complexe XRCC1/PARP1 servirait ensuite de socle au recrutement des autres protéines de la BER. De nombreuses interactions existent entre XRCC1 et d'autres protéines de la BER notamment avec APE1 et PNK. L'interaction de XRCC1 avec Pol β et la ligase III suggère une resynthèse par la voie courte pour la réparation des cassures simples brins.

c) Phénotypes associés à une déficience du BER

Plusieurs mutations dans des gènes codant pour des ADN *N*-glycosylases ont été recensées et associées à des pathologies spécifiques.

En effet, des mutations hétérozygotes dans le gène codant pour *MUTYH* ont été identifiées dans une famille atteinte de polypose adénomateuse familiale (Wilson *et al.*, 2007).

Des mutations récessives dans le gène codant pour *UNG* sont associées avec la maladie génétique de l'hyper IgM où les patients souffrent d'immunodéficience à cause de taux sériques normaux ou élevés d'immunoglobuline M (IgM), et l'absence d'IgG, IgA et IgE (Sousa *et al.*, 2007).

Les souris *NEIL1*^{-/-} développent les symptômes du syndrome métabolique, à savoir une obésité sévère, une hypercholestérolémie, une hyperinsulinémie ainsi qu'une accumulation de graisse dans les cellules du foie (stéatose hépatique) (Vartanian *et al.*, 2006). Le syndrome métabolique constitue un stade précoce de plusieurs maladies graves, comme le diabète de type 2, les troubles cardiovasculaires et les accidents vasculaires cérébraux. Les derniers chiffres parlent de 25 % de la population américaine, touchés par ce syndrome. La glycosylase *NEIL1* aurait donc un rôle préventif dans l'apparition de ces symptômes ; elle empêcherait l'accumulation de dommages oxydatifs dans l'ADN mitochondrial.

Les résultats, concernant les phénotypes associés à une mutation dans le gène codant pour la glycosylase *OGG1*, sont assez controversés. Cependant, il n'existe pas de phénotype particulier, dès la naissance, dû à une déficience pour *OGG1* comme c'est le cas pour les individus déficients pour la voie NER. En effet, les souris mutées pour *OGG1* ne présentent pas de phénotype particulier : il n'y a pas une augmentation de l'incidence de cancer ou un vieillissement particulier comme c'est le cas chez les souris déficientes pour le système NER (Klungland *et al.*, 1999b; Minowa *et al.*, 2000; Osterod *et al.*, 2001). Cependant, une étude chez des souris âgées (1 an ½) et mutées pour *OGG1* a montré une augmentation de l'incidence du cancer du poumon à mettre en relation avec l'accumulation de lésions 8-oxoG dans l'ADN des cellules pulmonaires (Sakumi *et al.*, 2003). Une étude très récente sur le polymorphisme du gène *OGG1* montre que l'activité de l'enzyme est diminuée de moitié lorsque la sérine en position 326 est substituée par une cystéine (Bravard *et al.*, 2009). Les dommages réparés par la BER sont des événements très fréquents dans l'organisme. Il est donc dangereux pour la cellule de laisser s'accumuler de tels dommages. C'est pourquoi un type de lésion, comme la 8-oxoG n'est pas pris en charge par une unique enzyme glycosylase dans le but d'optimiser au mieux sa réparation. Il existe donc des redondances dans la voie

BER où des enzymes ayant des spécificités d'action en théorie différentes peuvent tout de même prendre en charge la même lésion. Cette redondance empêcherait l'accumulation de bases désaminées, de bases oxydées et de cassures simples brins et expliquerait l'absence de phénotypique particulier associé à une déficience pour OGG1. Une autre hypothèse pour expliquer l'absence de phénotype particulier est l'intervention du système NER pour réparer les lésions prises en charge normalement par le système BER. Nous le verrons plus tard dans la partie II.C, il existe des interactions entre ces systèmes de réparation.

Les souris déficientes pour Pol β ne sont pas viables alors que les cellules embryonnaires correspondantes Pol $\beta^{-/-}$ sont cultivables et sont hypersensibles aux agents alkylants (Ochs *et al.*, 1999). Il existe une relation entre une déficience pour la Pol β et le cancer : chez l'Homme, 30% des tumeurs expriment des variants de Pol β (Starcevic *et al.*, 2004).

Une déficience pour la ligase I serait associée aux leucémies aiguës des cellules T, au syndrome de Bloom et à l'anémie de Fanconi (Averbeck 2000).

De nombreux travaux rapportent, également, l'hypothèse du rôle du stress oxydant dans les phénomènes de neurodégénérescence (D'Errico *et al.*, 2007a; Subba Rao 2007). Ainsi, un déficit dans le système BER pourrait être lié à des fonctions neuronales altérées (Kisby *et al.*, 2004; Kruman *et al.*, 2004).

d) Régulation de la voie BER

Contrairement à la réparation par excision de nucléotides, très peu de données sont disponibles concernant la régulation de la réparation par excision de base. Les activités glycosylases semblent être modulées par l'état du génome. La phase du cycle cellulaire pendant laquelle survient le dommage peut, ainsi, favoriser une enzyme plutôt qu'une autre (Hegde *et al.*, 2008). La quantité d'UNG est ainsi, régulée en fonction du cycle cellulaire, sa quantité doublant entre la phase G1 et la phase S (Nagelhus *et al.*, 1995). Cette régulation permettrait à la cellule, en augmentant sa quantité de glycosylase au cours de la division cellulaire, d'améliorer ses capacités de réparation, et ainsi de réduire le nombre de dommages transmis à sa descendance.

L'activité glycosylase est également différente suivant si la lésion se trouve dans une région du génome transcrite ou non (Mitra *et al.*, 2002). Ainsi, les glycosylases NEIL s'occuperaient préférentiellement des lésions situées dans les gènes actifs alors que OGG1 et NTH1 s'attacheraient à réparer les lésions des zones actives et non actives (Hazra *et al.*, 2007). En effet, contrairement à OGG1 et NTH1, NEIL1 et NEIL2 excisent préférentiellement la base lésée située dans de l'ADN localement simple brin ce qui peut être

le cas lors de la réplication et lors de la transcription de l'ADN (fourche de réplication, bulle de transcription) (Dou *et al.*, 2003).

Des modifications post-traductionnelles des protéines de la BER ont lieu afin d'orienter l'activité des enzymes. Les conséquences de ces modifications post-traductionnelles peuvent se manifester au niveau des caractéristiques de fixation des protéines, au niveau du turn-over des enzymes ou de la localisation sub-cellulaire des protéines. La principale modification post-traductionnelle est une phosphorylation (Almeida *et al.*, 2007) à l'origine d'une cascade de signalisation dont l'objectif est d'activer des points de contrôle afin d'éviter que la cellule ne se divise alors que les dommages ne sont pas réparés. *In vitro*, la phosphorylation d'OGG1 par Cdk4 augmente la capacité d'incision de la glycosylase de 2,5 fois (Hu *et al.*, 2005). De plus, l'enzyme OGG1 possédant deux localisations, nucléaire (forme α) ou mitochondriale (forme β), les activités de l'enzyme seront différentes suivant le compartiment (Boiteux *et al.*, 2000).

APE1 est une enzyme multifonctionnelle : elle joue un rôle, comme nous l'avons vu lors de l'excision du dommage, mais APE1 a aussi une importante activité régulatrice dans la cellule. Par exemple, APE1 stimule l'activité de fixation de p53 sur l'ADN en modifiant l'état redox de p53. Lorsque p53 est sous forme oxydée, elle ne peut se fixer à l'ADN ; cette activité devient possible lorsque p53 est réduite par APE1 (Jayaraman *et al.*, 1997). APE1 agirait comme un senseur de dommage et stimulerait les activités de réparation en déclenchant des cascades d'activation, dépendantes notamment de la signalisation par p53. La protéine p53 semble aussi jouer un rôle très important dans la régulation de la voie BER, et ce à deux niveaux : de manière indirecte, en régulant le niveau d'expression du gène codant pour la polymérase β (Seo *et al.*, 2002), et de manière directe, en interagissant et en stimulant l'activité de la polymérase β (Zhou *et al.*, 2001). L'implication de p53 dans la régulation de la réparation par excision de base souligne une nouvelle fois son rôle dans le maintien de l'intégrité du génome. Il a également été montré le rôle de APE1 dans la stimulation de l'activité OGG1 (Hill *et al.*, 2001). APE1 semble favoriser le renouvellement (*turn-over*) de l'enzyme, en stimulant son décrochement du site abasique.

La Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) est capable de polymériser de l'ADP-ribose sur d'autres protéines, mais aussi et, principalement, sur elle-même en utilisant du NAD^+ comme source d'ADP-ribose (Herceg *et al.*, 2001). Cette polymérisation lui permet de recruter des protéines, notamment lorsque la PARP est activée par la présence de cassures doubles brins, simples brins, ou de résidu 5'dRp (Leppard *et al.*, 2003). La PARP semble réguler la BER en agissant sur le recrutement spécifique de la protéine XRCC1, de la

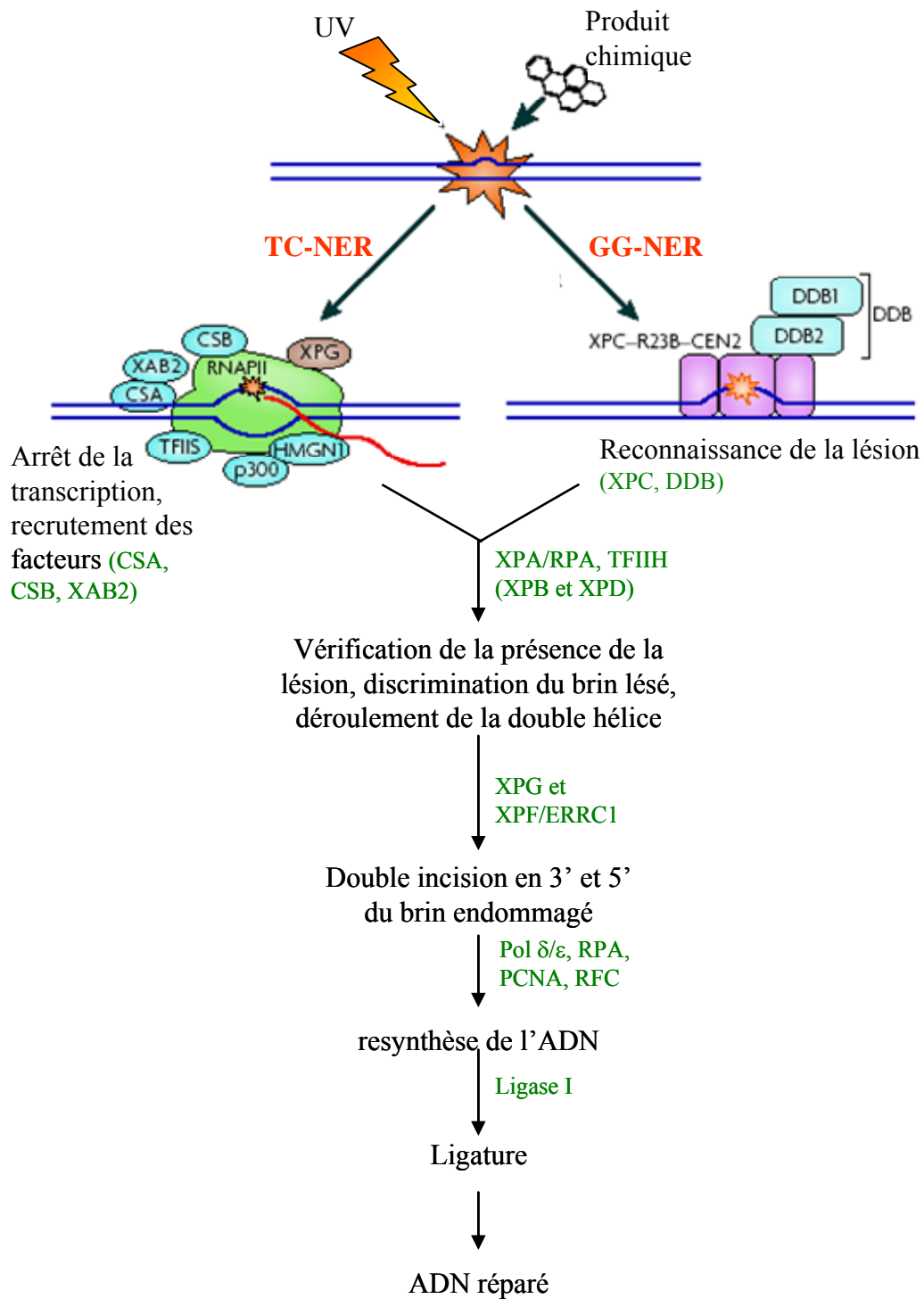


Figure 13: Les deux voies de la NER: TC-NER et GG-NER

polymérase β , et de la ligase III avec lesquelles elle peut interagir. Ce recrutement est modulé par l'état d'activation de la PARP qui dépendrait dans ce cas précis de la présence de résidus dRp, mais aussi de la concentration cellulaire en NAD^+ (Allinson *et al.*, 2003).

2. Réparation par excision de nucléotides : NER

La réparation par excision de nucléotides est un système de réparation versatile très largement répandu dans le monde vivant (de Boer *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2003). En effet, il est aussi bien présent dans les mycoplasmes que dans les cellules eucaryotes animales et végétales. Les premières publications décrivant ce système de réparation remontent à l'année 1964, au cours de laquelle plusieurs articles mirent en évidence ce mécanisme à la fois chez les Mammifères (Rasmussen *et al.*, 1964) mais aussi chez les Bactéries (Boyce *et al.*, 1964; Pettijohn *et al.*, 1964; Setlow *et al.*, 1964). Quatre ans plus tard, la découverte de l'implication de la NER dans la prévention du processus de carcinogenèse fut possible grâce aux travaux de J.E. Cleaver sur les cellules de patients atteints de Xeroderma pigmentosum (XP), une maladie génétique provoquant l'apparition précoce de cancers cutanés. Il fut notamment démontré que les cellules de patients XP étaient déficientes en réparation par excision de nucléotides (Cleaver 1968). Il restait alors à déterminer le mécanisme biochimique de la NER, la fonction des protéines impliquées et la manière dont elles s'assemblent. En 1986, I. Mellon et P.C. Hanawalt (Mellon *et al.*, 1986) démontrèrent que la NER peut être divisée en deux voies : la réparation couplée à la transcription (TC-NER) et la réparation globale du génome (GG-NER) (**Figure 13**).

a) Théorie du repairosome et de l'assemblage séquentiel

Deux théories s'affrontent par rapport au mode d'assemblage des protéines lors de la NER. La première théorie fait état de l'existence d'un « repairosome », où tous les facteurs de la NER sont pré-assemblés en l'absence même de lésion de l'ADN (Svejstrup *et al.*, 1995; He *et al.*, 1997). Un complexe unique permettrait alors la réalisation de toutes les étapes de la NER, de la reconnaissance du dommage jusqu'à la ligature. Une expérience de chromatographie d'affinité où la protéine XPA est fixée sur une colonne sur laquelle migre un lysat total de HeLa, permet de savoir quelles sont les protéines retenues par « la colonne XPA » (He *et al.*, 1997). Ainsi, les protéines XPA, RPA, ERRC1, TFIIH (XPB, XPD et p62), XPG, la sous-unité p140 de RFC, PCNA, les polymérases Pol δ et ϵ et la ligase I se fixent sur cette colonne. Ce complexe de protéines (repairosome) possède une activité de réparation puisque l'éluat est capable de réparer la lésion générée par le *N*-acetoxy-2-acetyl-amino-

-fluorène (NA-AAF). La théorie du repairosome est séduisante dans le sens où la réparation peut débuter à tout moment puisque toutes les protéines nécessaires à la réparation sont déjà assemblées et prêtes à fonctionner (Rechkunova *et al.*, 2008). Cependant, aucune étude *in vivo* n'a permis de mettre en évidence ce repairosome dans la cellule. En effet, le modèle du repairosome a été uniquement mis en évidence *in vitro*, où la préparation des lysats cellulaires entraîne des forces ioniques et des concentrations locales différentes de ce qui est trouvé *in vivo* (Rademakers *et al.*, 2003). De plus, le modèle du repairosome est souvent issu d'expériences de criblage double hybride ou d'immobilisation sur colonne. Dans ces deux cas, une concentration élevée d'un facteur de la NER (ex. XPA) peut artificiellement déplacer l'équilibre association/dissociation vers la fixation.

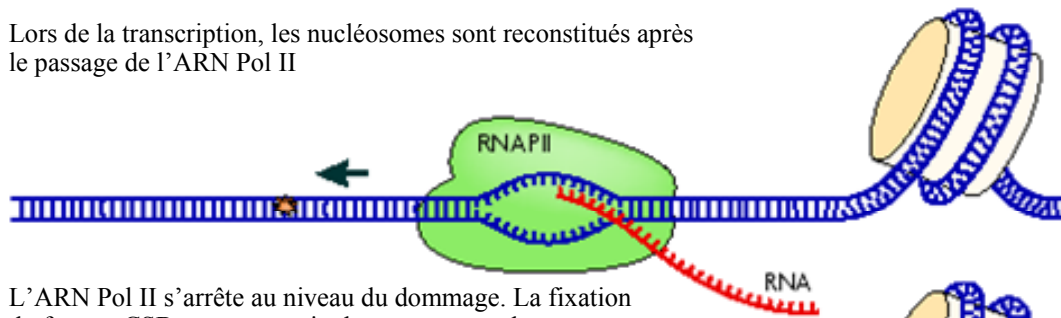
L'autre théorie concerne un assemblage séquentiel des protéines (Guzder *et al.*, 1996; Rademakers *et al.*, 2003; Gillet *et al.*, 2006). Cette théorie semble plus probable que la première car la dynamique d'association/dissociation améliore la flexibilité du système en augmentant le nombre de combinaisons possibles (Rechkunova *et al.*, 2008). Lors de l'assemblage séquentiel des protéines, trois complexes de pré-incision se succèdent (Mu *et al.*, 1997b). A partir de protéines purifiées, la NER peut-être reconstituée *in vitro*. Il se forme alors le PIC 1 (Pre-Incision Complex 1) constitué des protéines XPA, RPA, XPC/hHR23B et TFIIH. L'ADN est alors déroulé sur 5 à 10 nucléotides autour de la lésion. Ce complexe est relativement instable et est stabilisé par la fixation de XPG sur PIC1 (formation de PIC2). XPF/ERCC1 se fixe sur PIC2 pour former PIC3. La double incision peut avoir lieu. XPF/ERRC1 ne peut pas interagir avec PIC1 : dans la conformation PIC1, le site d'interaction de XPA avec XPF serait inaccessible.

Nous allons maintenant voir dans le détail les différentes étapes qui constituent le système de réparation par excision de nucléotides. La NER est divisée en deux voies, la réparation couplée à la transcription (TC-NER) et la réparation globale du génome (GG-NER). Ces deux voies ne diffèrent que par le processus de reconnaissance du dommage que nous allons présenter ici.

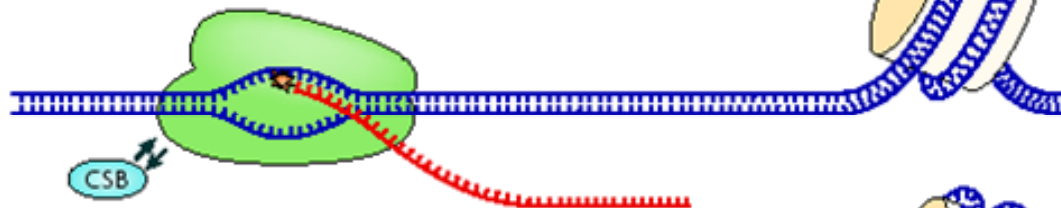
b) Déroulement de la voie NER

Comme pour la BER, quatre étapes peuvent résumer la NER: la reconnaissance du dommage, l'incision et l'excision du brin d'ADN contenant le dommage, la resynthèse du brin excisé, et enfin la ligature du brin néoformé (Gillet *et al.*, 2006; Sugasawa 2008). Alors que la voie NER fait intervenir une trentaine de facteurs *in vivo*, les systèmes reconstitués *in*

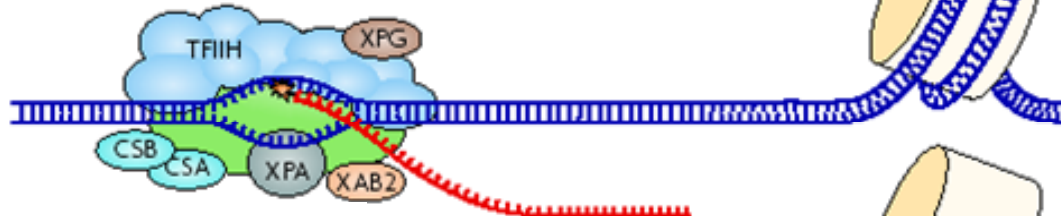
Lors de la transcription, les nucléosomes sont reconstitués après le passage de l'ARN Pol II



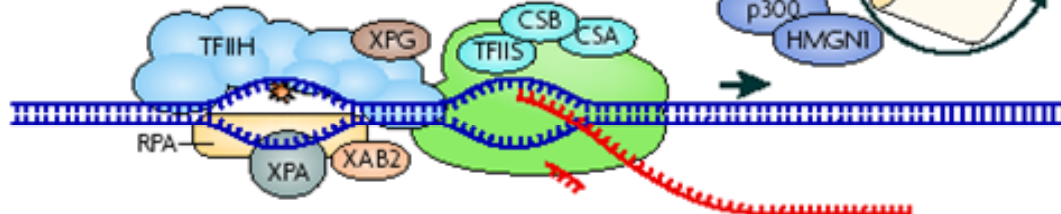
L'ARN Pol II s'arrête au niveau du dommage. La fixation du facteur CSB permet ensuite le recrutement des autres facteurs de réparation



Recrutement de TFIIH, XPG et RPA. XAB2 simule vraisemblablement la fixation de XPA



Recul de l'ARN Pol II



Ouverture de la double hélice au niveau du dommage. Excision et resynthèse de l'ADN

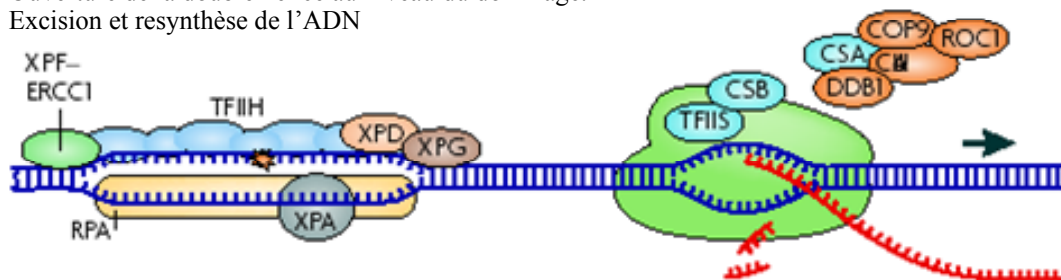


Figure 14: La TC-NER: arrêt de l'ARN Pol II et recrutement des différents facteurs de la réparation. Adapté de (Hanawalt *et al.*, 2008)

vitro mettent en évidence la nécessité de 6 facteurs pour pouvoir observer l'activité d'excision du dommage : XPC/HhR23B, XPA, TFIIH, RPA, XPG et XPF/ERCC1 (Aboussekhra *et al.*, 1995; Guzder *et al.*, 1995; Mu *et al.*, 1997b).

i. La reconnaissance de la lésion lors de la réparation couplée à la transcription

La réparation couplée à la transcription est un système puissant permettant à la cellule de réparer en priorité les gènes qui sont transcrits et donc importants pour la vie cellulaire (Svejstrup 2002; Laine *et al.*, 2006a). Si la TC-NER a été parfaitement élucidée chez les Bactéries, cette voie n'est pas encore complètement clarifiée chez les organismes supérieurs (Hanawalt *et al.*, 2008). Toutefois, la plupart des protéines impliquées ont été identifiées. Lors de la TC-NER, le blocage de l'ARN polymérase au niveau du site lésé constitue le signal permettant le recrutement des protéines de réparation (**Figure 14**). Lorsque la polymérase est bloquée, celle-ci passe d'un état hypophosphorylée à un état hyperphosphorylée. Trois protéines semblent impliquées dans cette étape: les protéines CSA et CSB, déficientes chez les patients atteints du syndrome de Cockayne, ainsi que la protéine XAB2 (XPA Binding protein 2) (Svejstrup 2002). La protéine CSB est une ATPase appartenant à la famille des protéines SWI/SNF2. CSB peut ainsi participer au réarrangement de la chromatine et peut également stimuler l'élongation de l'ARN pol II (Selby *et al.*, 1997b). Cette dernière caractéristique permettrait à CSB de forcer la transcription en stimulant l'addition par l'ARN pol II d'un nouveau ribonucléotide (correctement apparié ou non) en face de la lésion. Si cette transcription translésionnelle ne peut avoir lieu, la réparation par la voie TC-NER permettra alors la restauration de la séquence (Laine *et al.*, 2006a). La reconnaissance de l'ARN pol II bloquée au niveau de la lésion par les protéines CS et XAB2 entraîne le départ de la machinerie de transcription pour permettre le recrutement de la machinerie de réparation (Svejstrup 2002) (**Figure 14**). Plusieurs modèles s'affrontent pour expliquer ce que devient l'ARN Pol II ainsi que le transcrit (Hanawalt *et al.*, 2008) (**Figure 15**). Dans un premier modèle, l'ARN pol II reculerait de quelques nucléotides pour permettre à la machinerie de réparation de réparer le nucléotide endommagé bloquant la transcription. Un deuxième modèle prévoit, le retrait de l'ARN Pol II de l'environnement de l'ADN et sa dégradation par le protéasome. Cependant, le premier modèle semble plus probable puisqu'il permettrait de ne pas recommencer la transcription à chaque fois que la machinerie de transcription bute sur une lésion. Des études *in vitro* suggèrent un troisième modèle où la TC-NER pourrait avoir lieu avec la machinerie de transcription en place au niveau de la lésion (Hanawalt *et al.*, 2008). Ce modèle ne ferait pas intervenir CSB, mais XPG qui viendrait se fixer au niveau de

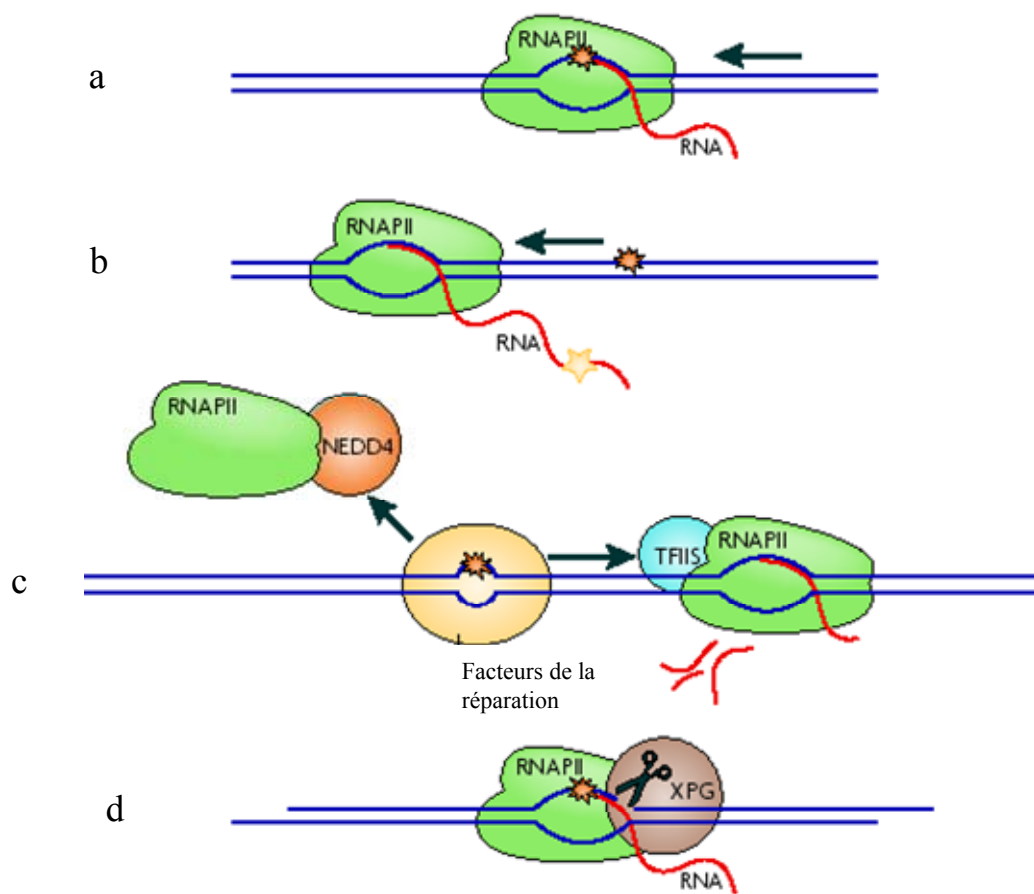


Figure 15: Le devenir de la machinerie de transcription

a/ Un arrêt prolongé de l'ARN Pol II au niveau de la lésion peut conduire à l'activation des points de contrôle et en dernier recours entraîner l'apoptose de la cellule. **b/** Pour certaines lésions, la transcription translésionnelle est possible mais n'est pas sans risque d'erreur. **c/** 2 possibilités pour l'accès au dommage par la machinerie de réparation. Soit l'ARN Pol II recule (aidée par TFIIS) et une partie du transcrit est dégradée, soit dégradation de la machinerie de transcription par le protéasome et dégradation complète du transcrit. **d/** Initiation de la réparation par XPG, sans le déplacement de l'ARN Pol II.

Adapté de Hanawalt *et al.*, 2008

la lésion et inciserait le brin d'ADN. Cette théorie semble cependant peu probable *in vivo* du fait de l'encombrement supplémentaire dû à l'organisation de la chromatine. De nombreuses autres protéines interviennent dans le complexe de reconnaissance de la voie TC-NER comme TFIIS (Transcription elongation Factor IIS), HMGN 1 (High-Mobility Group Nucleosome-binding domain-containing protein 1) et p300. Pendant que TFIIS permettrait la dégradation des derniers ribonucléotides du transcrit, HMGN 1 participerait au recul de l'ARN pol II et p300 serait impliqué dans le remaniement de la chromatine pendant la transcription et la réparation (Hanawalt *et al.*, 2008). Une fois que tous ces facteurs sont mis en place au niveau de la lésion, TFIIH déroule l'ADN autour de la lésion sur plusieurs nucléotides et la suite des événements est commune avec la GG-NER (incision du dommage, resynthèse de l'ADN et ligature) et implique les mêmes facteurs (XPA, TFIIH, XPG, XPF, polymérases δ et ϵ).

Le syndrome de Cockayne (CS) est une maladie génétique à caractère autosomique récessif où les enfants souffrent de retard de croissance, de problème de rétine, d'un retard neurologique et d'une importante photosensibilité. Cependant, contrairement à ce que nous verrons plus tard pour les patients XP, les enfants atteints du syndrome de Cockayne ne présentent pas une incidence accrue de cancérogenèse (Hanawalt 2000; Friedberg 2001). Les cellules issues de ces patients sont incapables de réaliser la TC-NER alors qu'elles présentent une GG-NER normale (Andrews *et al.*, 1978; Venema *et al.*, 1990a). Ces cellules présentent donc une incapacité à retrouver une synthèse d'ARN normale après une irradiation UV (RRS), alors que la resynthèse d'ADN non programmée (UDS) est normale. En effet, le CS est lié à une déficience pour la reconnaissance du dommage situé sur le brin transcrit. Ces patients présentent une protéine CSA ou CSB non fonctionnelle, déficience à l'origine de leur maladie. L'arrêt de l'ARN pol II au niveau d'une lésion bloquante ne sera pas reconnu par les protéines CS entraînant ainsi une importante mutagénicité et une instabilité chromosomique (Hanawalt 2000). De plus, un arrêt prolongé de la transcription peut conduire la cellule à la mort par apoptose. Ainsi, du fait du lien étroit existant entre la TC-NER et la transcription, le CS est considéré comme un syndrome dépassant une simple incapacité de réparation. Le syndrome de Cockayne pourrait être une maladie où les cellules meurent de façon excessive par apoptose. Cette hypothèse permettrait d'expliquer en majeure partie la grande sévérité des symptômes liés à cette maladie (Hanawalt 2000).

ii. La reconnaissance des dommages lors de la réparation globale du génome (GG-NER) :

La réparation globale du génome, contrairement à la TC-NER, ne répare pas l'ADN en fonction de son niveau de transcription. Elle répare aussi bien les zones non codantes que codantes, ainsi que les brins transcrits et non transcrits. La GG-NER est donc très importante pour les cellules qui se divisent et se différencient, car elles ont besoin de transmettre à leur descendance un génome exempt de toute erreur.

- Stratégie de reconnaissance de la lésion

La réparation par excision de nucléotides est un système de réparation très versatile permettant d'éliminer une grande variété de dommages tels que les photoproduits, les pontages intra-brin et les adduits volumineux comme ceux générés par le cisplatine ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Huang *et al.*, 1994a; Gillet *et al.*, 2006). Contrairement au système BER qui dispose d'une panoplie de glycosylases pour reconnaître le dommage, le système GG-NER dispose d'une protéine majeure XPC et d'une autre protéine XPE au rôle moins important. Ainsi, comment une seule protéine peut-elle reconnaître autant de dommages différents ? Pour répondre à cette question, plusieurs modèles ont été proposés quant à la nature des substrats de la voie NER.

Les lésions réparées par la NER présentent une caractéristique commune : elles déforment la structure tridimensionnelle de l'ADN. Lorsque l'ADN est traité par du *N*-acetoxy-2-acetylaminofluorène (NA-AAF), la guanine modifiée en l'adduit, généré par le traitement, n'est plus appariée avec la cytosine complémentaire (Garcia *et al.*, 1993). Les liaisons hydrogènes qui relient les deux bases complémentaires sont rompues. Il a même été montré que les bases voisines de l'adduit ne sont, elles aussi, plus appariées. Ainsi la double hélice est déformée, une sorte de bulle est formée au niveau de la lésion. Les lésions volumineuses comme les adduits ou les dimères de pyrimidines provoquent donc une oscillation anormale de la double hélice. Ce changement d'oscillation constituerait un signal de reconnaissance pour les protéines de la NER (Maillard *et al.*, 2008).

La protéine XPC ne reconnaîtrait pas directement le dommage mais plutôt le changement de conformation de la double hélice au niveau de la lésion (Gunz *et al.*, 1996; Buterin *et al.*, 2005; Maillard *et al.*, 2008). De plus, XPC aurait une préférence pour de l'ADN simple brin (Maillard *et al.*, 2008) et se fixerait sur le brin non endommagé en face de la lésion. Ce modèle permet d'expliquer la variété des substrats réparés par la NER puisque le



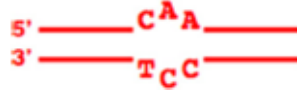
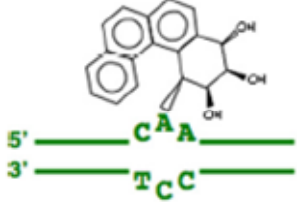
	Substrat	Excision ?
ADN intact		—
Adduit Benzo[c]phenanthrène		—
Les 3 mésappariements déforment l'ADN mais ne sont pas reconnus par la voie NER		—
Adduit et mésappariements : modification chimique et déformation		+

Figure 16: La reconnaissance bipartite du dommage de l'ADN: modification chimique de l'ADN et modification de la structure

facteur XPC ne reconnaît pas directement le dommage. De plus, en se fixant au niveau du brin complémentaire, XPC permet d'orienter le complexe d'incision pour que le brin non endommagé ne soit pas accidentellement incisé (Wood 1999).

La reconnaissance de la lésion est bipartite dans le sens où deux conditions doivent être réunies pour que le substrat soit reconnu par le système (**Figure 16**). En effet, la lésion doit entraîner une modification de la structure de la double hélice mais aussi une modification chimique de l'ADN (nucléotide endommagé) (Hess *et al.*, 1997a; Maillard *et al.*, 2008). Ce modèle de reconnaissance est valable pour XPC et XPE (Wittschieben *et al.*, 2005). Ainsi, le système NER est tout de même spécifique de certains dommages ; même si les mésappariements ou des boucles d'insertion/délétion de nucléotides déforment la double hélice, ces dommages ne sont pas excisés par le système NER (Buterin *et al.*, 2005) (**Figure 16**).

XPC n'intervient pas dans la TC-NER où l'ARN polymérase est stoppée au niveau du dommage. En effet, lors de la TC-NER, le dommage n'est pas dans un duplex d'ADN, mais plutôt dans une « bulle » engendrée par l'ouverture de la double hélice au moment où la polymérase transcrit. Ainsi l'ADN est déjà un peu ouvert donc XPC n'aurait pas besoin d'intervenir. Une expérience où le dommage est soit inséré dans une structure duplex soit dans une structure « pseudo transcriptionnelle » où une bulle a été formée autour de la lésion (Mu *et al.*, 1997a) montre que XPC est indispensable pour la réparation du dimère inséré dans le duplex, mais n'est pas requis pour la réparation de ce même dommage inséré cette fois au niveau d'une bulle. Ainsi, lorsque la distorsion de l'ADN est suffisante, la reconnaissance par XPC devient inutile ; les autres facteurs de la NER peuvent venir se fixer sur l'ADN sans son intervention (Wood 1999).

- Les facteurs impliqués dans la reconnaissance lors de la GG-NER et leur ordre de recrutement

Lors de la GG-NER, plusieurs protéines sont impliquées dans la reconnaissance des dommages. Si le complexe protéique XPC / hHR23B est l'élément essentiel de ce processus, la reconnaissance fait également intervenir XPE dans certains cas (**Figure 17**).

XPC / hHR23B intervient uniquement dans la GG-NER (Venema *et al.*, 1990b; van Hoffen *et al.*, 1995). La protéine XPC (125kD) est complexée au produit du gène hHR23B (58 kD) ainsi qu'à la centrine 2 (Araki *et al.*, 2001). hHR23B aurait un rôle stimulateur sur XPC *in vitro* (Sugasawa *et al.*, 1996) et serait en quantité plus abondante dans la cellule que XPC. La protéine XPC a la capacité de se fixer sur l'ADN, avec une affinité d'autant plus

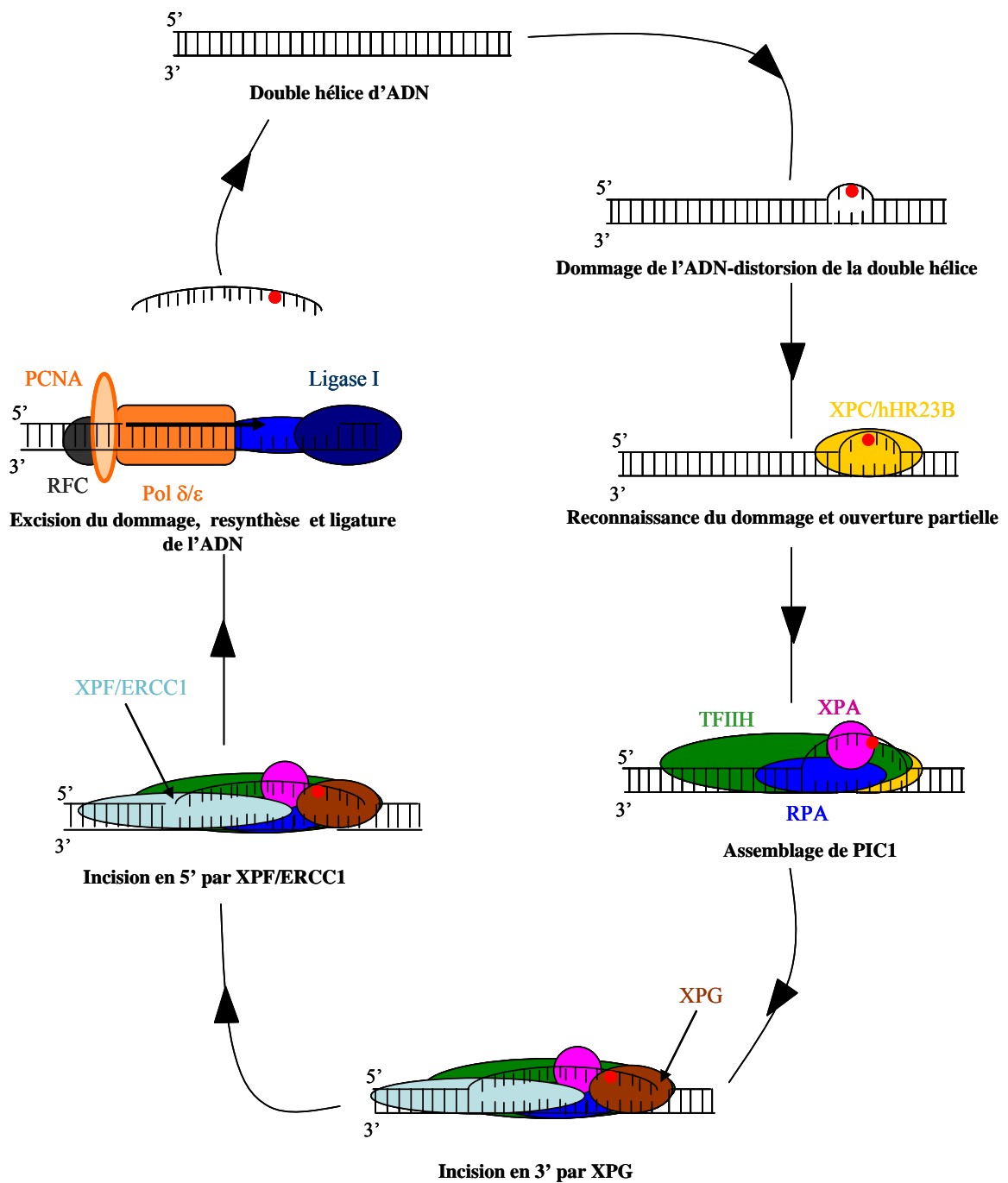


Figure 17: Les différentes étapes de la GG-NER

importante si l'ADN est endommagé (Batty *et al.*, 2000a; Sugasawa *et al.*, 2001; You *et al.*, 2003). En effet, le complexe XPC-hHR23B présente une affinité pour différentes lésions incluant les dommages causés par des produits chimiques et les photoproduits. Dans ce dernier cas, XPC semble avoir une meilleure affinité pour l'ADN comportant des photoproduits 6-4 que pour l'ADN comportant des CPDs (Batty *et al.*, 2000a; Kusumoto *et al.*, 2001). XPC / hHR23B ne se limite pas à la reconnaissance de l'ADN endommagé, dans le sens où il est aussi nécessaire au recrutement des protéines permettant de réaliser les étapes suivantes de la NER. Ainsi, XPC / hHR23B est nécessaire pour la formation du complexe de pré-incision dans la voie GG-NER (Aboussekhra *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1997; Mu *et al.*, 1997a). XPC participe au déroulement de la double hélice et à la stabilisation de cette structure ouverte (Mu *et al.*, 1997b). En effet, XPC interagit avec TFIIH et permet ainsi le recrutement de ce facteur sur le brin endommagé (Maillard *et al.*, 2008). Grâce à l'activité hélicase de la sous-unité XPD, le facteur se déplace le long du brin à la recherche du nucléotide endommagé (**Figure 18**). Le facteur TFIIH déroule l'ADN sur environ 20-25 paires de bases. Le duplex d'ADN est donc à ce moment là, largement ouvert autour de la lésion.

Même si cela a été longtemps contesté dans la littérature, il est désormais admis que lorsque la reconnaissance de la lésion est prise en charge par XPC, ce facteur est le premier à intervenir dans la voie NER (Sugasawa *et al.*, 1998). Ce modèle a mis fin à la théorie de Wakasugi et Sancar qui privilégiait XPA comme étant le premier facteur à intervenir dans la NER (Asahina *et al.*, 1994; Wakasugi *et al.*, 1999). Le fait que cette protéine présente une certaine affinité pour l'ADN endommagé, ainsi que la sévérité des cas de Xeroderma pigmentosum qu'elle engendre lorsqu'elle est mutée, en faisait une candidate idéale. Aujourd'hui son rôle semble plus clair, elle n'interviendrait pas dans l'étape précoce de reconnaissance (comme XPC et XPE), mais jouerait plutôt un rôle dans la stabilisation du complexe d'incision, et ce, de concert avec la protéine RPA (Batty *et al.*, 2000b). Cette stabilisation passerait par une reconnaissance du dommage, XPA / RPA aurait une fonction de vérificateur de la présence effective d'une lésion afin de ne pas réaliser d'incision dans un brin d'ADN non lésé.

Il a aussi été montré que l'étape de reconnaissance peut faire intervenir le complexe DDB1 / DDB2 (XPE) (Tang *et al.*, 2002). Si XPE n'est pas indispensable pour la voie NER *in vitro* (Aboussekhra *et al.*, 1995), son rôle semble important *in vivo* (de Laat *et al.*, 1999) puisque XPE permettrait la reconnaissance de dommages faiblement reconnus par XPC. XPE jouerait alors un rôle de « remplaçant », notamment pour la reconnaissance des dimères de

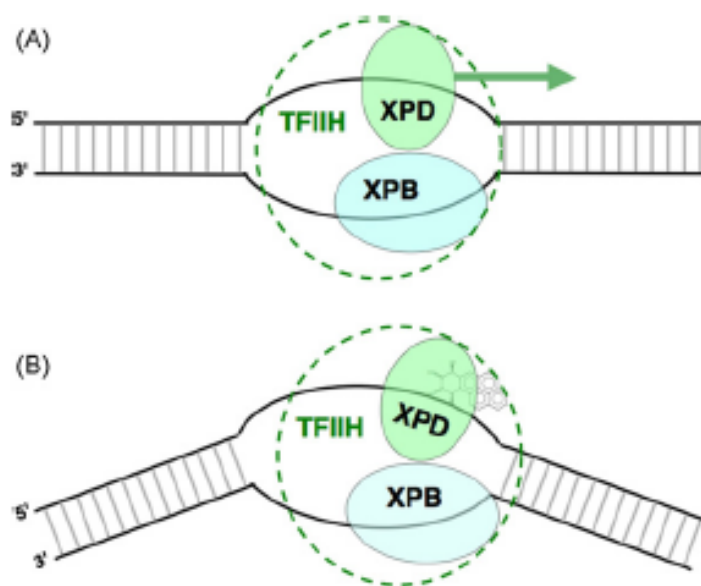


Figure 18: La reconnaissance de la lésion et le déroulement de la double hélice par TFIIH. Glissement de XPD à la rencontre de la lésion
Adapté de Maillard *et al.*, 2008

	XPC	hHR23B	TFIIH	XPA	RPA	XPG	XPF	ERCC1
XPC		X	X					
hHR23B	X							
TFIIH	X			X		X		
XPA			X	dimère	X			X
RPA				X		X	X	
XPG			X		X			
XPF					X			X
ERCC1				X			X	

Tableau 2 : Les interactions entre les facteurs de la voie NER

pyrimidine (Hwang *et al.*, 1999). Même si XPE reconnaît mieux les CPD *in vivo* que XPC, les 6-4 PP sont les photoproduits les mieux reconnus (Moser *et al.*, 2005). XPE reconnaît aussi d'autres dommages comme les adduits générés par le cisplatine (Buterin *et al.*, 2005). Le complexe DDB1 / DDB2 à lui seul ne permet pas à la NER d'avoir lieu ; la présence de XPC / hHR23B est nécessaire (Hwang *et al.*, 1999). Deux hypothèses s'opposent quant au mécanisme impliqué. La première suggère que DDB1 / DDB2 fixe le dommage puis recrute alors directement le complexe XPC / hHR23B (Fitch *et al.*, 2003; Moser *et al.*, 2005). La seconde, quant à elle, confère à DDB1 / DDB2 un rôle dans le remaniement de la chromatine permettant ainsi à XPC / hHR23B d'avoir accès au site lésé (Datta *et al.*, 2001). La fixation de XPE permettrait une distorsion suffisante de la double hélice pour que XPC puisse venir reconnaître le dommage (Tang *et al.*, 2002).

iii. L'étape d'incision et d'excision du dommage

Une fois que le dommage est reconnu, le complexe d'incision est alors formé afin d'éliminer la lésion. Le facteur TFIIH est tout d'abord recruté. TFIIH est un complexe protéique formé de 10 sous-unités (Sugasawa 2008) jouant un rôle dans l'initiation de la transcription, dans la voie NER et il aurait peut-être également un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (de Laat *et al.*, 1999). Il renferme notamment deux hélicases XPB (de 3' vers 5') et XPD (de 5' vers 3') qui, en présence d'ATP, permettent de dérouler la double hélice d'ADN (Schaeffer *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1997; de Boer *et al.*, 2000). Cette ouverture de la double hélice permet le recrutement des protéines nécessaires à la suite du processus de réparation. Les cellules déficientes pour ces protéines sont donc incapables d'ouvrir l'ADN lésé. TFIIH interagit avec XPG et XPA (**Tableau 2**). Le recrutement de TFIIH au niveau du dommage est opérationnel dans les cellules déficientes pour XPA, mais il est impossible dans les cellules XPC (Volker *et al.*, 2001). Ainsi le complexe XPC/hHR23B est essentiel à l'assemblage de TFIIH. Cependant, l'ouverture complète de la double hélice par XPB et XPD sur environ 25 nucléotides n'est possible qu'en présence des protéines XPA, RPA et XPG (Evans *et al.*, 1997).

Une fois que TFIIH a été recruté, la protéine XPA rejoint alors le complexe. La suite du processus d'incision se déroule avec le recrutement de la protéine RPA qui se fixe à XPA, et de l'endonucléase XPG qui se positionne en 3' de la lésion. XPC et hHR23B quittent alors le complexe de réparation (Wakasugi *et al.*, 1998; Wakasugi *et al.*, 1999). XPG interagit avec TFIIH, RPA et PCNA (Tableau 2). XPG peut se fixer au niveau du complexe de pré-incision indépendamment de XPA (Volker *et al.*, 2001). Cependant, l'incision en 3' ne peut avoir lieu

Nom de la protéine de la NER	Autre nom	Locus	Nb résidu	Poids moléculaire (kDa)	Homologue S.cerevisiae	Rôle dans GG-NER	Rôle dans TC-NER	Protéine couplée	Fonction de la protéine	% de réparation résiduelle (UDS)	Phénotype XP associé à une déficience pour la protéine
XPA		9p34.1	273	31	RAD14	X	X	RPA (RFA1 chez la levure)	Protéine à doigt de zinc. Reconnaissance et vérification du dommage. Recrute XPF et active XPG	2 à 5	Possibilité de troubles neurologiques.
XPB	ERCC3, p89 TFIIH	2q21	782	89	RAD25/SSL2	X	X		Hélicase 3' - 5'	3 à 7	Très peu de malade. Possibilité combinaison XP/TTD (rare) et XP/CS.
XPC		3p25.1	940	125	RAD4	X		HHR23B (RAD 23 chez la levure) et Centrine 2	Reconnaissance de la lésion. 1ère prot du GG-NER. Recrute les autres facteurs	5 à 20	Groupe de patient le plus important en nombre.
XPD	ERCC2, p80 TFIIH	19q13.2	760	87	RAD3	X	X		Hélicase 5' - 3'	25 à 50	Groupe le plus complexe: patients XPD, patients XP/TTD et patients XP/CS
XPE	DDB2	11p11-12	427	127+48		X			Protéine dimérique. Reconnaissance de la lésion (CPD). Expression dépendante de p53	> à 50	Patients peu affectés.
XPF	ERCC4	16p13.3	916	103	RAD1	X	X	ERCC1 (RAD10 chez la levure)	Endonucléase en 5' de la lésion. Coupe après XPG	18	Très peu de malade. Essentiellement patients japonais
XPG	ERCC5	13q32-33	1186	133	RAD2	X	X		Endonucléase en 3' de la lésion. Appartient à la famille FEN-1. Interagit avec PCNA	< à 2	Très peu de malade (essentiellement patients européens). Patients sévèrement atteints. Combinaison XP/CS.
XPV		6p21	713	78					Synthèse translesionnelle. ADN polymérase groupe Y: PolH (hRad30A). Faible fidélité	100	Après irradiation UV, effet toxique de la caféine
CSA	ERCC8, CKN1	5q12.1	396	44	RAD28		X		Protéine à motif WD répété. Ubiquitylation de la ligase E3. Après UV, association avec ARN PolII	100	sensibilité au soleil, nanisme, dégénérescence rétinienne, caries, microcéphalie, ostéoporose, perte auditive, myélinisation anormale
CSB	ERCC6	10q11-21	1493	168			X		Association avec ARN PolII. Fixation sur la lésion dépendante de la présence d'ATP. Motif hélicase. Famille SWI/SNF	100	

Tableau 3 : Les différents facteurs de la NER, leur fonction et les phénotypes associés à une déficience

sans XPA ; XPA couplée à RPA stimulerait l'incision faite par XPG (Mu *et al.*, 1996). RPA semble jouer un rôle très important dans le positionnement des endonucléases sur l'ADN. En effet, RPA interagit en même temps avec les deux endonucléases (différents domaines d'interaction au niveau de RPA) (de Laat *et al.*, 1999).

Le duplex ERCC1 / XPF, qui tout comme XPG a une activité endonucléase, se positionne en 5' de la lésion. Contrairement au recrutement de XPG au niveau du dommage, celui de XPF est dépendant de XPA (Volker *et al.*, 2001). Les endonucléases XPG et XPF/ERCC1 réalisent la double incision du brin endommagé respectivement en 3' et 5' ; l'incision en 3' a lieu en premier. Cette étape est dépendante des ions Mg^{2+} , cations nécessaires à l'activité endonucléase de XPG. Cette double coupure est asymétrique : l'incision est réalisée de 2 à 8 nucléotides en 3' de la lésion et de 15 à 24 nucléotides en 5' de la lésion (Huang *et al.*, 1992). La position exacte de la coupure semblerait dépendre du type de la lésion (de Laat *et al.*, 1999). Un fragment de plusieurs nucléotides (24 à 32 nucléotides) est ainsi incisé puis excisé (c'est-à-dire enlevé de l'environnement proche de l'ADN) ce qui différencie la NER de la BER où seule la base endommagée est enlevée. Une fois ce fragment excisé aucune des protéines de la NER ne restent fixée sur celui-ci, à part RPA (Riedl *et al.*, 2003).

iv. L'étape de resynthèse et de ligature

Le facteur commun entre l'incision du dommage et la resynthèse de l'ADN est RPA. Il reste fixé au brin non endommagé après l'excision du dommage afin de faciliter l'ancrage du complexe de resynthèse. La resynthèse fait intervenir les polymérases répliquatives δ et ϵ . PCNA agit en tant que facteur de processivité à ces deux polymérases et la resynthèse nécessite également le facteur de réplication C (RF-C). *In vitro*, la resynthèse peut être reconstituée uniquement avec RPA, PCNA, RF-C et les deux polymérases (de Laat *et al.*, 1999). Les polymérases resynthétisent l'ADN dans le sens 5' vers 3' en prenant comme modèle le brin complémentaire. La ligature du brin en 3' de la nouvelle séquence néosynthétisée avec le brin original constitue la dernière étape de la voie NER. Cette étape est réalisée par la ligase I. Rappelons que la ligase I intervient également dans la voie de resynthèse longue du système BER.

Le rôle de chaque protéine de la NER est récapitulé dans le **tableau 3**.

c) Cinétique de réparation

Il semblerait que les protéines de la NER quittent l'environnement du dommage de l'ADN 4h après une irradiation UV même si la lésion n'a pas pu être réparée (Wang *et al.*, 2003). La réparation par la NER semble donc être un système relativement rapide mais la réparation est à priori moins rapide que lors de la BER. La vitesse de réparation dépend de la localisation de la lésion dans le génome et de la nature du dommage. En effet, la cinétique de réparation dépend de l'activité du gène : une lésion prise en charge par la TC-NER est réparée plus vite que la même lésion située sur un brin non transcrit d'un gène actif (prise en charge alors par la GG-NER). Si la réparation a lieu sur un brin transcrit, 80% des CPDs sont réparés au bout de 8h alors que seulement 15-30% des CPDs sont réparés au même moment sur un brin non transcrit (Costa *et al.*, 2003).

De plus, les dommages photoinduits ne sont pas réparés à la même vitesse. Alors que la quasi-totalité des 6-4 PPs est réparée en moins de 4h, moins de 50% des CPDs sont réparés (Wang *et al.*, 2003; Courdavault *et al.*, 2005). Rappelons pourtant que les CPDs sont les dimères majoritairement formés après une irradiation UV. Les photoproduits 6-4 déformeraient plus l'ADN que les CPDs (Taylor *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1995) ; cette différence peut expliquer la réparation plus ou moins rapide de ces deux dommages puisque nous avons vu l'importance de la structure tridimensionnelle de l'ADN au moment de la reconnaissance. Ainsi, les photoproduits 6-4 sont réparés rapidement alors que la réparation des CPDs laisse présager une réponse biphasique plus lente. Après une exposition au *N*-acetoxy-2-acetylaminofluorène (NA-AAF) mimant l'effet des UV au niveau de l'ADN, 40 à 50% des lésions dG-C8-AF (N-(deoxyguanosine-8-yl)-2 aminofluorène déacétylé) seraient réparées au cours d'une période de 6 à 8 h suivant le traitement ; les lésions restantes seraient réparées plus lentement jusqu'à 48 h après le traitement (van Oosterwijk *et al.*, 1996).

d) Signalisation

Suite à un stress génotoxique exogène, la cellule met en place une réponse spécifique faisant intervenir un grand nombre de facteurs. La cascade de réponse permet entre autre de réguler le système de réparation par excision de nucléotides.

i. ATR : senseur de dommages et transducteur du signal

La cellule a besoin de senseurs capables d'activer des effecteurs ; cela lui permet d'adapter son niveau de réparation. Les protéines senseurs sont capables de détecter des dommages avec une très grande sensibilité pour ensuite amplifier le stimulus initial (*ie.* lésion de l'ADN) et permettre une réponse cellulaire adaptée. La protéine ATR (Ataxia Telangiectasia mutated and Rad3 related) est un des principaux senseurs permettant de réguler la NER. ATR est une kinase appartenant à la famille des protéines kinases PIKK (Phosphatidylinositol 3-kinase-like protein-kinases) (Abraham 2001; Houtgraaf *et al.*, 2006). Cette protéine est présente dans le noyau sous forme de dimère avec ATRIP (ATR-Interacting Protein), et peut se fixer sur les fourches de réplication bloquées, ainsi que sur les dommages UV induits. La nature exacte du signal qui va déclencher la réponse cellulaire suite au dommage n'est toujours pas totalement clarifiée. RPA peut participer au recrutement du complexe ATR-ATRIP lorsque RPA est fixé sur de l'ADN simple brin (Rouse *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2003). C'est le cas lorsque le fragment d'ADN contenant le dommage est excisé par la NER. Les cellules déficientes pour XPA irradiées par des UV sont bloquées pour la réplication de leur ADN. Cet arrêt de la réplication devrait constituer un signal pour ATR et il devrait y avoir la mise en place de la cascade de signalisation. Or, dans ces cellules il n'y a ni phosphorylation de H2AX (dépendante de ATR), ni accumulation de p53. Ainsi, XPA semble lui-même jouer un rôle dans l'activation de point de contrôle (Bomgarden *et al.*, 2006). Ceci implique que la NER serait aussi régulée par ses propres intervenants (RPA et XPA). D'un autre côté, le complexe ATR-ATRIP peut directement reconnaître le dommage sans que celui-ci soit en cours de réparation (Jiang *et al.*, 2006). Dans l'un ou l'autre de ces cas, ATR s'autophosphoryle, et déclenche alors une cascade de signalisation par phosphorylations successives qui aboutissent à l'activation de différents effecteurs tels que (Abraham 2001) : p53 qui est un des principaux effecteurs agissant sur la NER et le cycle cellulaire, BRCA1 qui est impliqué dans la recombinaison homologue et Chk1 qui va permettre de bloquer le cycle cellulaire.

Tous ces effecteurs sont essentiels quant à l'adaptation de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Comme nous allons le voir, la protéine p53 est impliquée fortement et à plusieurs niveaux dans la régulation de la NER.

Il est à noter qu'une voie de signalisation très similaire existe, elle a pour senseur ATM qui est aussi une protéine de la famille des PIKK. Cette voie est décrite comme pouvant être

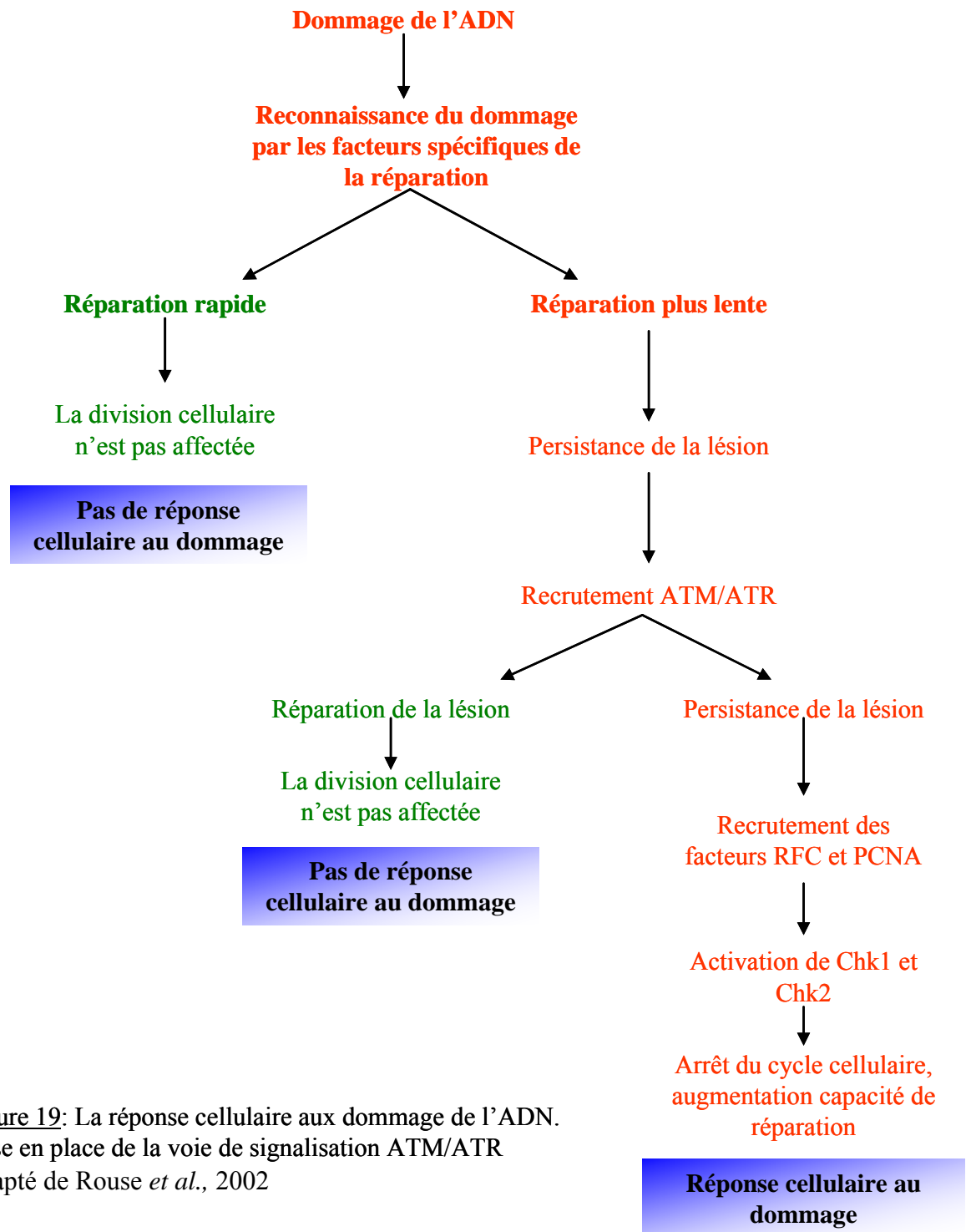


Figure 19: La réponse cellulaire aux dommages de l'ADN.
Mise en place de la voie de signalisation ATM/ATR
Adapté de Rouse *et al.*, 2002

activée par la présence de cassures dans l'ADN, elle a aussi p53 comme effecteur central. Elle pourrait donc par l'intermédiaire de p53 réguler aussi la NER.

La signalisation des dommages de l'ADN n'étant toujours pas complètement élucidée, il est de plus en plus évoqué l'implication d'un autre complexe en amont d'ATR (ATM). Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, il s'agit du complexe Rad9/Rad1/Hus1 (Abraham 2001). Chez les Mammifères, le complexe RF-C/PCNA jouerait le rôle de senseur primitif du dommage. PCNA peut être comparé à un anneau encerclant l'ADN et glissant le long de la double hélice lors de la réplication (*sliding clamp*). Ainsi PCNA pourrait être le premier facteur rencontrant le dommage.

La réponse à un dommage peut être résumée par le modèle présenté dans la **figure 19** (Rouse *et al.*, 2002). Le dommage occasionné serait donc reconnu en premier lieu par les facteurs spécifiques de la NER. Dans certains cas, la lésion peut être réparée facilement et rapidement. La réparation agit alors sans qu'une réponse cellulaire n'ait été mise en place. C'est ce qui se passe avec les lésions « non déformantes » comme les modifications de base réparées par la BER. Si la réparation ne peut avoir lieu rapidement, la lésion persiste. Les senseurs de dommage (ATM/ATR) migreraient alors vers le site lésé. Cette translocation des senseurs se ferait donc après la reconnaissance du dommage par la NER. Si la réparation peut avoir lieu facilement, la cascade de signalisation n'est pas déclenchée. Au contraire, si la cellule n'arrive pas à réparer le dommage, les senseurs vont amplifier le signal et toute une série d'événements vont permettre d'augmenter les capacités de réparation de la cellule. Ces événements incluent un arrêt du cycle cellulaire, un possible remaniement de la chromatine et une régulation positive de la voie NER. Après une irradiation UV, les cellules en culture s'arrêtent en phase G1 (arrêt dépendant de p53) et en G2 (arrêt indépendant de p53) (Pavey *et al.*, 2001).

ii. p53 : un effecteur important régulant la NER

La protéine p53, aussi appelée protéine gardienne du génome, est impliquée dans beaucoup de processus cellulaires, comme notamment l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, mais aussi la réparation de l'ADN (Vousden *et al.*, 2002; Millau *et al.*, 2008a). Elle est très fortement impliquée dans la régulation de la réparation par excision de nucléotides et ce à deux niveaux (Ford *et al.*, 1997; Ford 2005). Premièrement au niveau transcriptionnel : une fois activée par phosphorylation (par exemple par la voie de signalisation ATR), la protéine p53 forme un tétramère et peut directement induire la transcription des gènes codant pour les deux protéines de reconnaissance de dommage de la GG-NER, à savoir XPC et

DDB2. Cette induction est rendue possible grâce au rôle de facteur de transcription que joue alors p53 en se fixant à son élément de réponse qui est présent au niveau des promoteurs respectifs des gènes *XPC* et *DDB2* (Hwang *et al.*, 1999; Adimoolam *et al.*, 2002). Le deuxième niveau de régulation, controversé, se ferait par une interaction directe de p53 avec XPB et XPD appartenant au complexe TFIIH (Wang *et al.*, 1995). Cependant, les conséquences de cette interaction ne sont pas claires et pourraient jouer un rôle plus important dans la régulation de l'apoptose que dans celle de la NER (Wang *et al.*, 1996).

Enfin, les cellules p53^{-/-} réparent les dommages 6-4 PPs comme les cellules sauvages mais une diminution significative de la réparation des CPDs est observée (Wang *et al.*, 2003). Ainsi, suivant la nature du dommage, la régulation par p53 semble plus ou moins jouer un rôle important.

iii. L'ubiquitination des protéines de reconnaissance de la NER

L'ubiquitination est un mécanisme impliqué dans la régulation et la dégradation des protéines. L'ubiquitination consiste en l'ajout d'un peptide d'ubiquitine sur une protéine ; le degré d'ubiquitination peut varier et conduire à des conséquences diverses. La polyubiquitination a comme principale conséquence la dégradation de la protéine par le complexe du protéasome, la monoubiquitination quant à elle semblerait moduler l'activité des protéines, leur localisation, ainsi que leurs interactions.

- L'ubiquitination de DDB2

Il a été montré que, bien qu'étant induite après une irradiation UV, DDB2 est rapidement dégradée. Une hypothèse pour expliquer cette dégradation serait l'élimination de DDB2 permettant ainsi l'accès de la protéine XPC au dommage. Cette régulation par ubiquitination rajoute un niveau de complexité à la régulation de DDB2 qui est aussi dépendante de p53 (von Mikecz 2006).

- L'ubiquitination de XPC

La protéine XPC est, elle aussi, régulée par ubiquitination car, tout comme DDB2, sa dégradation est stoppée par les inhibiteurs du protéasome. La protéine hHR23B régulerait cette dégradation en masquant le site d'ubiquitination de XPC lorsque ces deux protéines sont sous forme de complexe (Ng *et al.*, 2003).

iv. *Le trafic cellulaire des protéines de la NER*

Une récente étude révèle le rôle de la protéine MAD2 (Mitotic Arrest Déficiant 2) dans la redistribution sub-cellulaire des protéines de la réparation après un traitement des cellules par le cisplatine (Fung *et al.*, 2008). Cette protéine interagirait avec XPD dans le cytoplasme et empêcherait son entrée dans le noyau lorsque l'ADN n'est pas endommagé. Après un traitement par le cisplatine, cette interaction diminuerait en faveur d'une interaction entre XPD et XPA et leur translocation vers le noyau.

La régulation de la NER est donc un phénomène très complexe permettant à la cellule d'ajuster finement son activité de réparation par excision de nucléotides et ainsi de s'adapter à son environnement. Elle peut avoir lieu à différents niveaux : du senseur à l'effecteur en passant par les protéines de reconnaissance des dommages.

B. Voies alternatives

Comme nous l'avons vu, pour répondre aux attaques que subit le génome, la cellule met en place toute une panoplie de réponses pour restaurer l'information génétique et pouvoir la transmettre correctement à sa descendance. Si les systèmes BER et NER apparaissent comme les voies majeures d'excision du dommage et resynthèse de l'ADN, des voies alternatives ont cependant été élucidées.

1. AP endonucléase et la voie NIR (Nucleotide Incision Repair)

Dans la partie II.A.1.a.ii, nous avons évoqué le rôle de APE1 dans l'incision de l'ADN après l'enlèvement de la base endommagée par une ADN *N*-Glycosylase.

APE1 peut également réaliser la coupure de l'ADN comportant une base modifiée sans le recours d'une ADN *N*-glycosylase. Ce mécanisme appelé Nucleotide Incision Repair (NIR) a été étudié essentiellement par l'équipe de M.K. Saparbaev. En 2002, des expériences conduites sur un oligonucléotide de 30 paires de bases contenant une lésion oxydative (5,6-dihydropyrimidine) incubé avec les enzymes purifiées Nfo, Xth (Bactérie) et HAP-1 (APE1) (Mammifère) montrent que la lésion est directement incisée par l'activité endonucléase de ces enzymes (Ischenko *et al.*, 2002). Ainsi cette voie de réparation est indépendante de celle empruntant une ADN *N*-Glycosylase pour enlever la base endommagée et la NIR est donc une voie alternative à la BER.

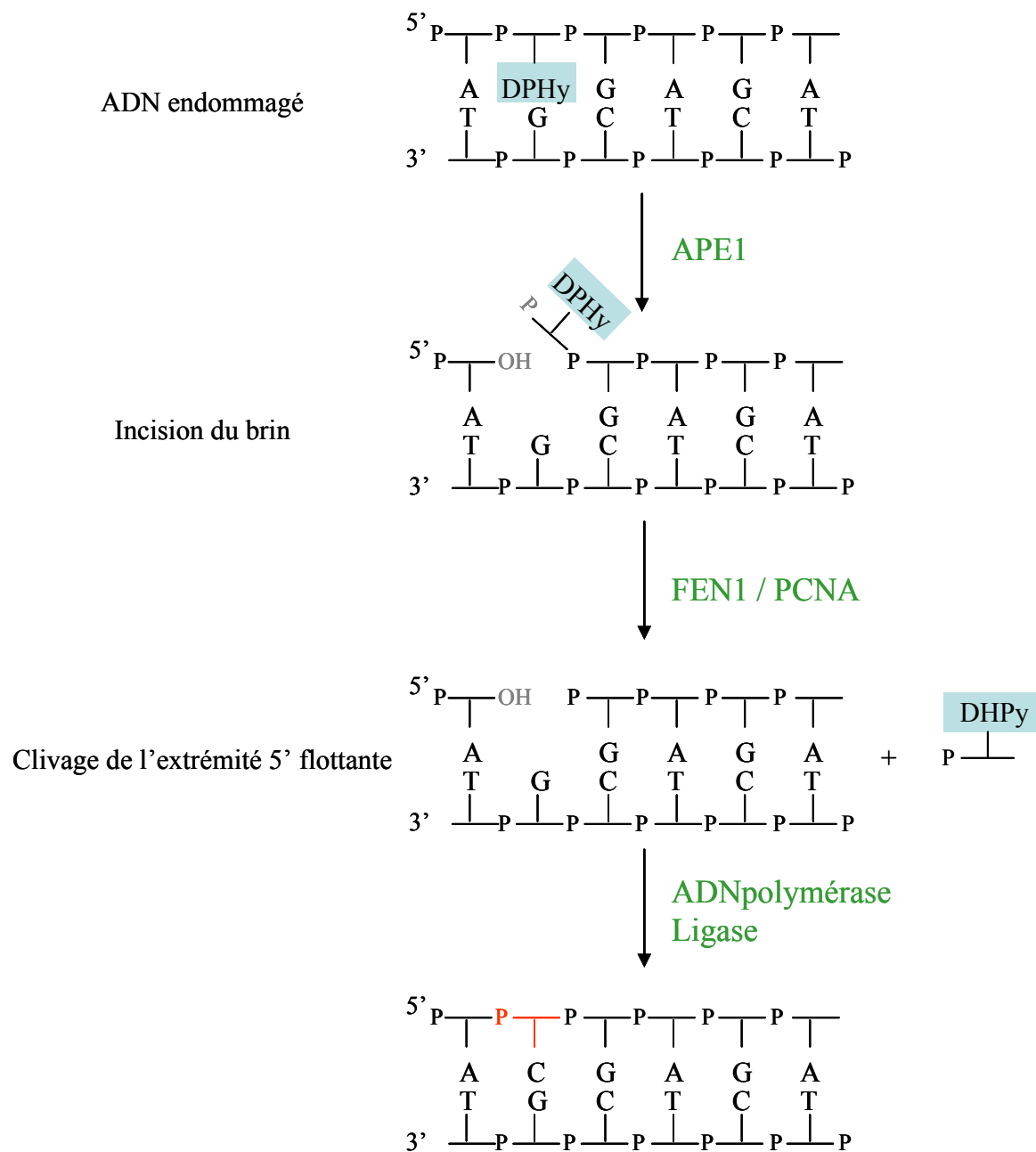


Figure 20: Le mécanisme d'action de la NIR

DPHy: 5,6-Dihydropyrimidine

La coupure par l'AP endonucléase conduit à une extrémité 3'OH et à une extrémité 5'P (**Figure 20**). La voie NIR présente ainsi l'avantage de générer des extrémités immédiatement « utilisables » pour l'étape de resynthèse par les polymérases contrairement à ce qui se passe lors de la BER où les extrémités doivent être modifiées pour que la resynthèse puisse avoir lieu. Dans le modèle proposé, l'enzyme APE1 coupe la liaison phosphodiester en 5' de la lésion. Ainsi, l'extrémité 5' flottante (contenant le dommage) serait ensuite clivée par le complexe FEN1/PCNA et la resynthèse de l'ADN réalisée par les polymérases. Comme lors de la BER, cette resynthèse peut emprunter deux voies (courte ou longue) faisant intervenir ainsi la Pol β , ou la Pol β et Pol δ/ϵ (Gros *et al.*, 2002). Cependant, il semblerait que l'extrémité 5' flottante ne soit pas rapidement clivable, ce qui favorise la voie longue.

Cette voie alternative reconnaît un grand nombre de dommages oxydatifs ; le système NIR agit donc de concert avec la BER pour la réparation de ce type de dommages. La lésion 5-hydroxycytosine (5ohC) est faiblement incisée par les glycosylases NTH1, NEIL1 et NEIL2 alors que APE1 répare cette lésion de façon beaucoup plus efficace du fait de la forte concentration de cette enzyme dans les lysats cellulaires (Waters *et al.*, 1999). Cette voie alternative permet entre autre d'expliquer le phénotype normal associée à une déficience pour une ADN N-Glycosylase.

En 1996, les travaux de Hang *et al.* mettent en évidence l'incision d'un adduit de l'ADN (formé par un dérivé du benzène) par l'APE1 (Hang *et al.*, 1996). Cette expérience montre donc ici que la NIR peut aussi être une voie alternative de la NER.

2. La glycosylase NEIL, enzyme alternative pour la réparation des adduits et pontages inter-brins

L'ADN N-Glycosylase NEIL1 peut inciser des dommages normalement réparés par la NER. En effet, NEIL1 serait capable d'inciser des pontages inter-brins et des adduits de l'ADN formés suite à un traitement par du psoralène photoactivé (Couve-Privat *et al.*, 2007). Les autres glycosylases de la BER ne sont pas capables d'inciser ce type de dommage (NTH1, OGG1). Comme lors de la BER, NEIL1 incise le brin d'ADN pour former une extrémité 3'P. L'extrémité est ensuite modifiée par APE1 pour que la resynthèse par Pol β puisse avoir lieu. Ainsi, l'enzyme NEIL1 n'interviendrait pas uniquement dans la BER « au secours » des autres glycosylases, mais cette enzyme aurait un rôle plus complexe, reconnaissant des dommages de structure très variée. Comme cela a déjà été évoqué, l'enzyme NEIL1 est également spécifique des dommages situés dans les régions localement simple brin de l'ADN, comme c'est le cas lors de la transcription ou de la réplication.

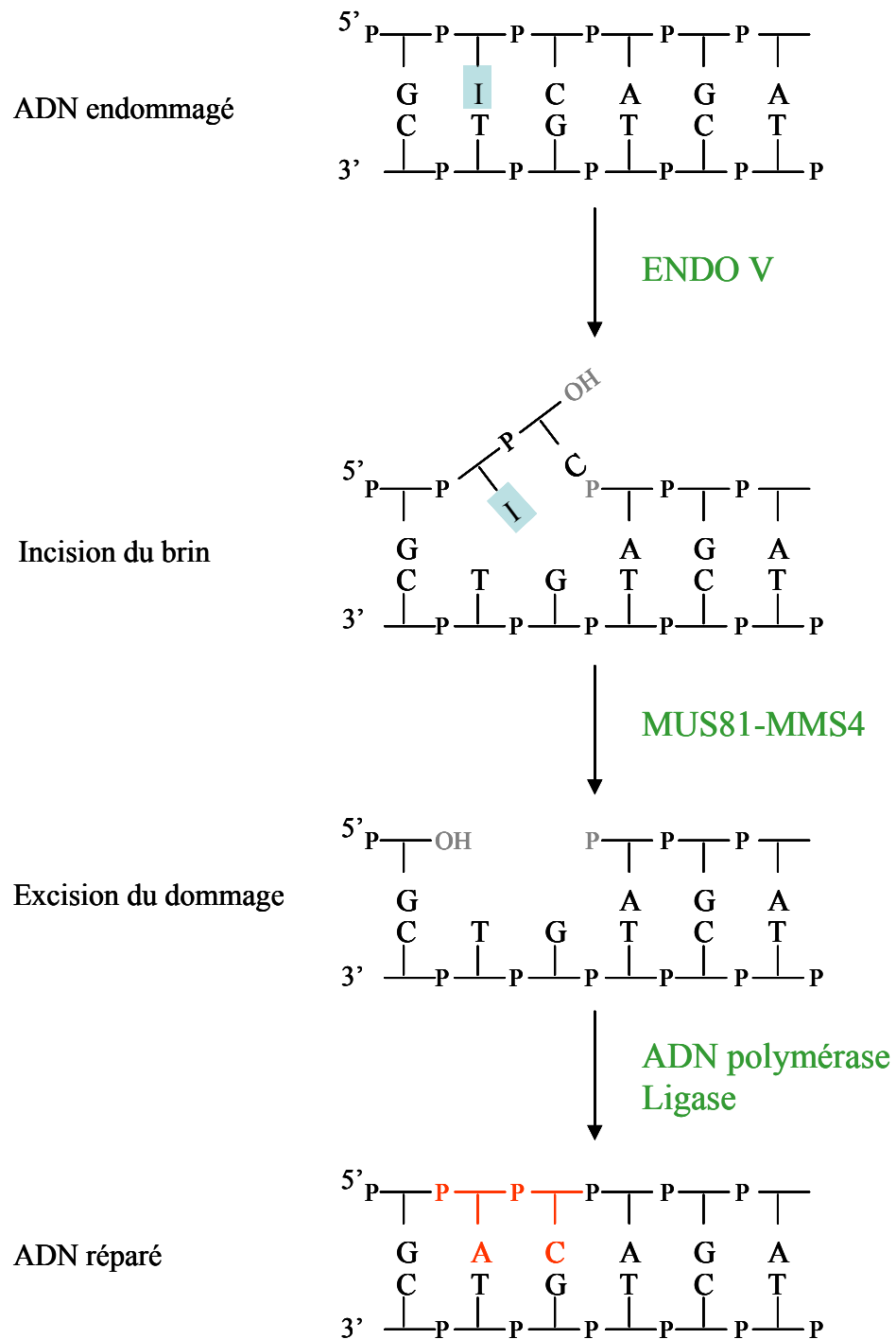


Figure 21: Le mécanisme d'action de l'endonuclease V

I: Insoine

3. Endonucléase V

L'endonucléase V (Endo V) purifiée chez *E.coli* réalise une coupure en 3' de la lésion (Demple *et al.*, 1982). Cette enzyme prend en charge une variété de substrats ne présentant pas forcément des similitudes structurales (Kow 2002). L'incision réalisée par cette enzyme est à distinguer de ce qui se passe lors de la BER puisqu'elle n'a pas lieu sur le dommage lui-même mais au niveau du nucléotide suivant. Ainsi l'endonucléase V n'agit pas comme une ADN *N*-glycosylase ; l'action de l'endonucléase V n'entraîne pas la libération d'une base libre (Kow 2002). La **figure 21** présente le mécanisme de réparation alternatif par l'Endo V. L'enzyme réalise la coupure de la liaison phosphodiester en 3' du nucléotide suivant le nucléotide endommagé. Cette coupure en 3' est ensuite suivie d'une coupure en 5' de la lésion par l'APE1 ou le complexe MUS81/MMS4. Deux nucléotides sont excisés par ce mécanisme ; une polymérisation suivie d'une ligature permet de retrouver une molécule d'ADN intacte.

Des alignements de séquence avec le gène *nfi*⁺ (codant pour l'Endo V) ont permis d'identifier un orthologue de cette protéine chez l'Homme et la Souris (Moe *et al.*, 2003). L'Endo V de Souris est une protéine de 37 kDa capable d'inciser l'hypoxanthine et l'uracile de l'ADN. Comme les souris déficientes pour l'enzyme MPG, prenant en charge l'hypoxanthine, ne présentent pas de phénotypes particuliers, l'activité redondante de l'Endo V permettrait d'expliquer cette absence de phénotypes chez ces souris. Il semblerait donc que les Bactéries et les Eucaryotes disposent de deux mécanismes pour réparer la base désaminée : une des stratégies implique des glycosylases spécifiques (BER) et la deuxième fait intervenir l'endonucléase V. L'activité de cette enzyme chez l'Homme n'a jamais été réellement mise en évidence, le mode d'action alternatif reste donc hypothétique (Kow 2002).

Les mécanismes de la BER et de la NER semblent donc être secondés par des voies alternatives qui viendraient en soutien au niveau de certaines étapes pour permettre au mieux le maintien de l'information génétique. Ces voies alternatives complexifient la vision de la réparation de l'ADN par excision-resynthèse. Nous allons voir maintenant qu'il existe des interactions entre les systèmes de réparation BER et NER ce qui ajoute encore un niveau de complexité.

C. Interaction entre les systèmes de réparation

Les systèmes de réparation par excision-resynthèse ont longtemps été appréhendés comme des mécanismes bien distincts, réparant des dommages spécifiques et faisant intervenir des

enzymes bien définies. Cependant, il est de plus en plus démontré que les systèmes BER et NER ne sont pas aussi cloisonnés.

1. Rôle des protéines XP dans la réparation des dommages oxydatifs

De nombreuses études montrent l'implication des protéines XP dans la réparation des dommages oxydatifs, normalement référencés comme des dommages pris en charge par la BER. Ainsi, les protéines de la NER sont capables de réparer *in vitro* la 8-oxoG et les diols de thymine (Reardon *et al.*, 1997) comme le suggère l'incision d'un oligonucléotide lésé (lésion 8-oxoG ou diol de thymine) par le système NER reconstitué à partir des protéines purifiées XPC/hHR23B, XPA, RPA, TFIIH, XPG et XPF/ERCC1. L'intervention des facteurs de la NER dans la réparation des dommages oxydatifs est une hypothèse permettant d'expliquer l'apparition de troubles neurologiques chez les patients XP (Balajee *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2005); l'accumulation de lésions oxydatives dans les cellules neuronales seraient à l'origine de ces troubles.

Ces interactions ne sont pas nécessairement associées à une compétition entre les systèmes de réparation : les différents systèmes agiraient plus de façons complémentaires et coopératives (Yang 2006). Par exemple, suivant la phase du cycle cellulaire, un système de réparation pourrait agir préférentiellement. Les systèmes de réparation peuvent agir de façon coopérative dans le sens où la reconnaissance du dommage par une protéine spécifique peut faciliter le recrutement d'autres protéines ou améliorer les fonctions catalytiques d'une protéine appartenant à un autre système. Le but étant toujours d'accroître les capacités de réparation de la cellule.

Concrètement, il a été montré que XPC stimule l'activité de la Thymine DNA *N*-Glycosylase (TDG) (Shimizu *et al.*, 2003), enzyme impliquée notamment dans la reconnaissance des mésappariements G/T. XPC/hHR23B interagit et stimule également OGG1, enzyme impliquée dans la réparation de la 8-oxoG (D'Errico *et al.*, 2006; Bernardes de Jesus *et al.*, 2008). Enfin, les fibroblastes et kératinocytes déficients pour la protéine XPC sont plus sensibles à un traitement par le bromate de potassium (KBrO₃) que les cellules normales ce qui est en faveur d'une incapacité des cellules XPC à réparer les lésions engendrées par le traitement oxydant.

Il a aussi été démontré que les facteurs hHR23 (A et B) jouant un rôle stimulateur pour la reconnaissance du dommage par XPC lors de la NER peut également jouer ce rôle avec la Methyl Purine DNA Glycosylase (MPG), enzyme intervenant dans la réparation des bases alkylées (Miao *et al.*, 2000).

Les cellules déficientes pour la protéine XPA réparent moins bien que les cellules normales les dommages induits par un stress H₂O₂ (Low *et al.*, 2008) ou ceux induits par l'éclairage des cellules avec une lampe fluorescente (Lipinski *et al.*, 1999). Cependant, le rôle de XPA dans la réparation des dommages oxydatifs est beaucoup moins élucidé que celui de XPC (Dusinska *et al.*, 2006).

RPA semble pouvoir interagir avec l'UNG, enzyme impliquée dans la réparation de l'uracile dans l'ADN (Nagelhus *et al.*, 1997; Mer *et al.*, 2000). Comme RPA et XPA agissent ensemble lors de la NER, RPA pourrait être le lien entre XPA et la réparation des dommages oxydatifs.

Enfin, l'endonucléase XPG peut elle aussi améliorer l'activité (d'un facteur 2) de la glycosylase bifonctionnelle NTH1 responsable de la réparation des diols de thymine (Bessho 1999; Klungland *et al.*, 1999a). Cette intervention de XPG dans la BER serait liée à la réparation d'une lésion oxydative située sur un brin transcrit.

2. Rôle des protéines CS dans la réparation des dommages oxydatifs : couplage de la BER et de la transcription

Contrairement à ce qui se passe lors de la NER, il n'y a pas de système BER spécifique pour la réparation d'un dommage survenant sur un brin transcrit. Cependant, toutes les lésions prises en charge par la BER ne bloquent pas la transcription. En effet, la 8-oxoG bloque que très légèrement l'avancement de la transcription par l'ARN polymérase II lors d'expériences *in vitro* (Khobta *et al.*, 2008) et n'est pas un obstacle à la transcription lors d'études *in vivo* (Larsen *et al.*, 2004). Concernant les autres dommages réparés par la BER, un diol de thymine ne bloque également pas la transcription *in vitro* par l'ARN Pol II (Tornaletti *et al.*, 2001), contrairement à un site abasique (Tornaletti *et al.*, 2006) ou une cassure simple brin (Kathe *et al.*, 2004).

D'un autre côté, plusieurs études ont montré la sensibilité des cellules CS à un stress oxydant impliquant ainsi les protéines CSA (D'Errico *et al.*, 2007b) et CSB dans la réparation des dommages oxydatifs comme la 8-oxoG (Dianov *et al.*, 1998; Tuo *et al.*, 2003; de Waard *et al.*, 2004). Cette incapacité à réparer les dommages oxydatifs chez les patients atteints du syndrome de Cockayne expliquerait les troubles neurologiques sévères dont ils souffrent. CSB pourrait interagir avec des ADN N-Glycosylases (Stevnsner *et al.*, 2008) ou avec la PARP1 (Thorslund *et al.*, 2005), protéines jouant un rôle important lors de la BER.

Si le couplage entre la TC-NER et la BER n'est pas encore clairement élucidé, il est cependant évident qu'il existe des interactions entre ces deux systèmes de réparation. Une hypothèse serait que la 8-oxoG ne bloque pas la transcription mais lorsqu'elle est en cours de

réparation par OGG1, le site abasique ou la coupure simple brin résultant de l'action de la glycosylase entraîneraient l'arrêt de l'ARN Pol II (Khobta *et al.*, 2008). CSB interviendrait alors pour faire le lien entre la BER et la TC-NER.

Les systèmes de réparation apparaissent donc plus complexes que la vision segmentée que nous pouvions en avoir. Les complémentarités et les interactions qui les régissent demandent donc de les appréhender de façon plus globale.

Nous allons, maintenant, nous intéresser à la maladie génétique liée à une déficience pour la réparation de l'ADN, le Xeroderma pigmentosum.

III. Le Xeroderma pigmentosum

Différentes maladies héréditaires sont dues à une déficience dans un des systèmes de réparation présentés précédemment. Nous pouvons citer (Christmann *et al.*, 2003; Lehmann 2003; Cleaver 2005):

- Le cancer du colon héréditaire sans polypose (Syndrome de Lynch) (défaut du MMR)
- Le Xeroderma pigmentosum classique (défaut de la NER)
- Le Xeroderma pigmentosum groupe V (défaut de la synthèse translésionnelle)
- La Trichothiodystrophie (défaut de la NER)
- Le syndrome de Cockayne (défaut de la TC-NER)
- L'ataxie Télangiectasie (Syndrome de Louis-Bar) (déficience dans le signallement des cassures doubles brins)
- Le syndrome de Werner (défaut dans la recombinaison homologue)
- Le syndrome de Bloom (défaut dans les 3R de l'ADN : réplication, recombinaison et réparation)
- Le syndrome de Rothmund-Thomson (défaut de la réparation des cassures doubles brins)
- L'anémie de Fanconi (défaut de la réparation des pontages inter-brins)

Le Xeroderma pigmentosum (XP) a été décrit pour la première fois en 1863 par Moritz Kaposi. En 1882, le dermatologue autrichien Ferdinand Ritter von Hebra (Stary *et al.*, 2002; Leibel *et al.*, 2006) donna le nom de Xeroderma à cette maladie, ce mot latin signifiant « peau en parchemin ». Le terme pigmentosum fut rajouté plus tard pour souligner les problèmes importants de pigmentation dont souffrent les personnes atteintes. Il faudra attendre 1968 pour que les scientifiques s'intéressent à cette maladie, et cette rencontre est en

partie due au fruit du hasard (Cleaver 1968). En effet, J.E. Cleaver, qui travaillait alors sur la réparation de l'ADN, cherchait désespérément à obtenir des mutants afin de réaliser des expériences de complémentations et ainsi valider ses travaux sur la NER (Friedberg *et al.*, 2006). C'est en parcourant un journal local que son attention fut attirée par un article traitant du Xeroderma pigmentosum, la décrivant comme une maladie héréditaire prédisposant au cancer induit par le soleil. Il eut alors rapidement l'intuition que cette maladie devait être liée à une déficience des systèmes de réparation. Il réussit à obtenir des biopsies de peau de patients, et il montra que leurs fibroblastes présentaient un défaut de réparation de l'ADN après une exposition aux UV. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans cette maladie pouvaient alors débiter.

A. Signes cliniques et origines de la maladie

1. Description de la maladie

a) Incidence et variabilité géographique

Le syndrome du Xeroderma pigmentosum est une maladie génétique rare ; c'est une maladie classée orpheline où moins de 3000 cas sont recensés dans le Monde. Les deux parents doivent être porteurs d'au moins un allèle muté et doivent le transmettre à leur descendance ; la transmission de cette maladie se fait donc suivant un mode autosomique récessif. Du fait de son origine génétique, le syndrome XP est favorisé par la consanguinité (31 % des cas). La fréquence de la maladie varie suivant les régions du monde : une forte incidence est observée dans les pays du Maghreb et en Afrique où les mariages consanguins sont plus fréquents. L'incidence de la maladie en Amérique du Nord et en Europe de l'ouest est de 1/1 000 000 naissances (Kleijer *et al.*, 2008) (source HAS 2007), et elle atteint 1/100 000 au Proche-Orient et au Japon.

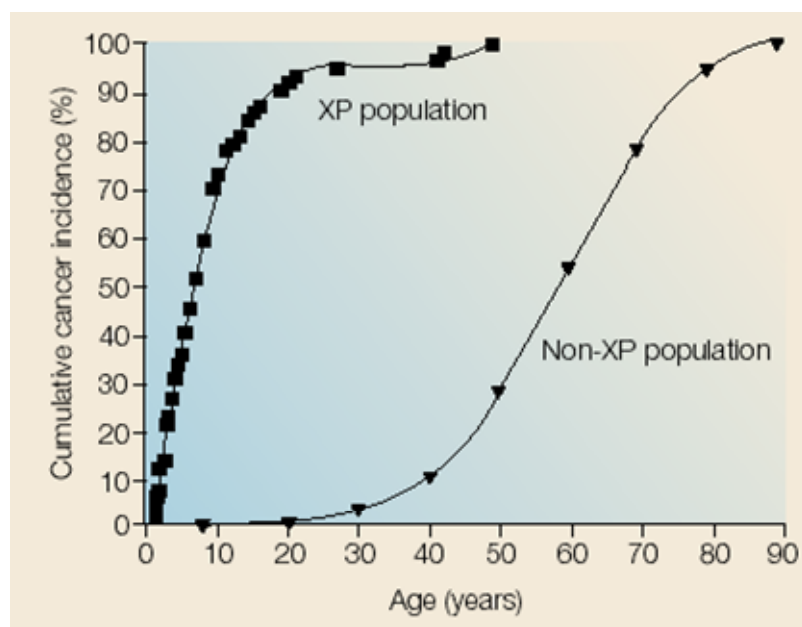


Figure 22: La prédisposition des patients XP au cancer cutané
(Friedberg 2001)

b) Les symptômes du Xeroderma pigmentosum

i. Problèmes cutanés et cancers de la peau

D'une façon générale, les patients atteints du XP sont hypersensibles aux UV. *In vitro* et *in vivo*, les cellules XP sont hypermutées après une exposition aux UV (Sarasin 1999). Dès leur plus jeune âge (les premiers signes de la maladie apparaissent dans 75% des cas dans les deux premières années de la vie), suite à une exposition au soleil, les enfants présentent de nombreux troubles cutanés, comme des défauts de pigmentation, certaines zones étant dépigmentées alors que d'autres sont hyperpigmentées (Kraemer *et al.*, 1987). Leur peau est caractérisée par un vieillissement accéléré, et présente un nombre très important de taches de rousseur. Ainsi lorsque la peau d'un patient XP est exposée au soleil, les UV provoquent des lésions de l'ADN qui ne seront pas réparées. Le défaut de réparation, notamment des dommages UV, que présentent les patients atteints de Xeroderma pigmentosum les rend particulièrement prédisposés aux cancers cutanés. Chez 50% des patients XP, le protooncogène *RAS* est muté et chez plus de 80% des patients le gène *p53* est muté (Daya-Grosjean *et al.*, 2005). Ainsi une accumulation de mutations dans les gènes régulateurs clés, conduit à la formation de cancer de la peau. Leur risque de développer un mélanome est 2000 fois supérieure à celle d'un individu sain ; pour les autres types de cancer cutané (*ie.* carcinomes), leur prédisposition est 4800 fois supérieure à la normale (Lehmann 2003) (**Figure 22**). Cette prédisposition aux cancers cutanés se manifeste précocement en moyenne vers l'âge de 8 ans chez les patients XP contre 50-60 ans dans la population normale (Daya-Grosjean *et al.*, 1995; Leibel *et al.*, 2006). La prédisposition à d'autres types de cancer devrait, elle aussi, théoriquement être supérieure à celle d'individus sains, cependant l'espérance de vie courte (30 ans) (de Boer *et al.*, 2000) ainsi que le faible nombre de malades ne permettent pas de mettre en évidence ce phénomène (Friedberg *et al.*, 2006). Le Xeroderma pigmentosum constitue un modèle d'étude de référence pour comprendre les cancers de la peau puisqu'ils apparaissent 40 à 50 ans plus tôt que chez les individus normaux. Ce modèle permet également de montrer les conséquences associées à une déficience de la réparation de l'ADN dans l'apparition des cancers.

ii. Problèmes oculaires et buccaux

Outre les problèmes cutanés, les personnes atteintes de Xeroderma pigmentosum présentent aussi des problèmes oculaires au niveau des paupières et de la cornée (Norgauer *et al.*, 2003). La langue et les lèvres, ces zones étant particulièrement sensibles au rayonnement UV, sont également sujettes à une évolution cancéreuse. Certains enfants XP sont également prédisposés à développer des caries.

iii. Déficience immunitaire

Les défenses immunitaires des patients XP sont aussi vraisemblablement affaiblies (Bridges 1998; Sarasin 1999; Daya-Grosjean *et al.*, 2005) avec la diminution de l'activité des cellules « natural killer » responsables de l'immunité innée et la diminution de la production d'interféron. 20% des patients XP présentent une immunodéficience (Daya-Grosjean *et al.*, 1995).

iv. Troubles neurologiques

Enfin, environ 20% des patients XP souffrent de troubles neurologiques dès le début de l'enfance avec une mort neuronale prématurée, un retard mental et une microcéphalie (Daya-Grosjean *et al.*, 1995). Les patients XP souffrant de troubles neurologiques sont ceux qui ont une déficience à la fois pour la GG-NER et pour la TC-NER. Ces problèmes neurologiques pourraient être expliqués par une accumulation de dommages dans les neurones qui les conduirait à la mort par apoptose (Balajee *et al.*, 2000; Leibel *et al.*, 2006). Une implication des protéines de la NER dans la réparation des dommages oxydatifs (CF partie II.C), pourrait expliquer pourquoi des personnes atteintes de Xeroderma pigmentosum présentent une dégénérescence neurologique (Reardon *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 1999; Rolig *et al.*, 2000).

La super oxyde dismutase est l'enzyme permettant la dégradation des radicaux libres dans le système nerveux central. Il existe deux types de SOD suivant leur localisation cellulaire : la Cu/ZnSOD se situe dans le cytoplasme alors que la MnSOD se situe dans les mitochondries. Il a été montré que l'activité de ces deux enzymes est diminuée dans le cerveau de patients XPA (Hayashi *et al.*, 2005). Les patients présentant des troubles neurologiques peuvent cependant être divisés en deux classes : les formes de XP simples comme XPA et XPG développant des troubles neurologiques caractérisés par une neuro-

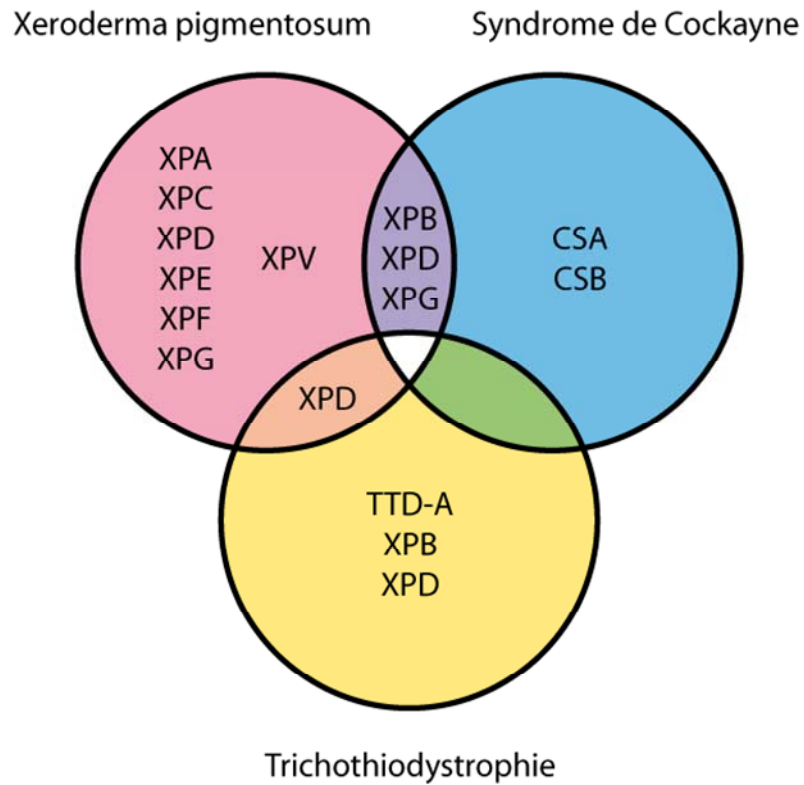


Figure 23: Les 3 maladies principales résultant d'une déficience de la NER, et leurs formes combinées

Le gène TTD-A muté dans certains cas de Trichothiodystrophie code pour le facteur TFB5, sous-unité de TFIIH (Giglia-Mari *et al.*, 2004)

-dégénérescence et les formes combinées XP/CS et XP/TTD où les troubles sont eux plutôt associés à une démyélinisation.

2. Les patients XP sont déficients pour la NER

Les travaux de J.E Cleaver ont démontré pour la première fois, en 1968, la relation de cause à effet entre les symptômes observés chez les enfants XP et leur incapacité à réparer les dommages UV-induits. Les patients XP sont incapables de réparer les photoproduits mais aussi les dommages provoqués par de nombreuses molécules cancérogènes. De plus, certains patients présentent des troubles neurologiques qui seraient corrélés avec l'incapacité des cellules du cerveau à réparer les dommages oxydatifs (Rolig *et al.*, 2000). Les troubles neurologiques observés chez ses patients sont en faveur de l'interaction des protéines XP avec la voie BER, comme cela a été évoqué ci-dessus.

Les patients XP peuvent être divisés en deux sous-familles : les XP classiques qui concernent des mutations sur les gènes XPA, B, C,..., G et les XP variants communément appelés XPV représentant 20 à 30% des patients XP (Daya-Grosjean, Dumaz *et al.* 1995) (Daya-Grosjean and Sarasin 2005). Les patients XPV portent eux une mutation au niveau de la polymérase η (H ou η) ; ils développent des tumeurs plus tardivement que les XP classiques et la sensibilité aux UV est moins importante (Daya-Grosjean, Dumaz *et al.* 1995). Il ne faut pas oublier que le Xeroderma pigmentosum peut être combiné au syndrome de Cockayne que nous avons évoqué précédemment et à un deuxième syndrome, la trichothiodystrophie (TTD) qui est également une maladie de la réparation par excision de nucléotides (Lehmann 2001) (**Figure 23**). Dans les formes combinées, les patients sont très sévèrement atteints et leur espérance de vie est fortement diminuée.

Le test UDS (Unscheduled DNA Synthesis) permet de mesurer les capacités de réparation de cellules issues de patients XP. Les niveaux de resynthèse d'ADN non programmés sont très variables suivant les groupes de complémentation comme nous le verrons, ci-dessous, dans la partie 3 (Bootsma *et al.*, 1970). Cette hétérogénéité dans les capacités de réparation confirme que les protéines XP jouent des rôles différents, plus ou moins clés pour la réparation par excision-resynthèse. Les différents groupes de complémentation (A à G) ont été petit à petit identifiés grâce à une mesure de l'UDS après avoir fusionné deux cellules XP de donneurs différents déjà identifiés (Kraemer *et al.*, 1975). Si les cellules fusionnées sont issues de deux groupes de complémentation différents, la

Groupe de complémentation	Gene	Fréquence	Cancer cutané	Phénotype
A	<i>XPA</i>	élevée	+	XP avec des troubles neurologiques plus ou moins sévères
B	<i>XPB</i>	rare	+ -	XP/CS TTD
C	<i>XPC</i>	élevée	+	XP sans troubles neurologiques
D	<i>XPD</i>	moyenne	+ + + -	XP avec des troubles neurologiques plus ou moins sévères XP/CS XP/TTD TTD
E	<i>DDB2</i>	rare	+	XP sans troubles neurologiques
F	<i>XPF</i>	rare	+	XP sans troubles neurologiques
G	<i>XPG</i>	rare	+ +	XP avec des troubles neurologiques plus ou moins sévères XP/CS
V	<i>POLH</i>	élevée	+	XP sans troubles neurologiques

Tableau 4 : Relation génotype-phénotype pour la maladie Xeroderma pigmentosum

déficience pour une protéine de la NER d'une cellule sera ainsi complétée par la présence et l'activité normale de cette protéine dans l'autre cellule et inversement. Si les deux cellules fusionnées proviennent du même groupe de complémentation les déficiences ne pourront pas se compléter donc le niveau d'UDS de l'hétérocaryon restera faible. Les mutations dans un gène *XP* peuvent être nombreuses, situées à différentes positions du gène. Ces mutations peuvent être homozygotes c'est à dire que les deux allèles du gène portent la même mutation, ou hétérozygotes lorsque chaque allèle est muté mais la mutation n'est pas la même.

3. Spécificités cliniques des différents groupes de complémentation

Les différentes mutations dans les gènes *XP* présentées ci-dessous ont été recensées sur le site Internet <http://xpmutations.org> . Les caractéristiques phénotypiques de chaque groupe sont répertoriées dans le **tableau 4**.

a) XPA

Avec *XPC* et *XPB*, le groupe *XPA* représente 90% des patients *XP*. Les patients *XPA* sont essentiellement localisés au Japon (Stary *et al.*, 2002). Les cellules de patients *XPA* sont extrêmement sensibles à l'effet cytotoxique des UV (10 fois plus sensibles que le témoin), et possèdent une très faible activité NER (< 2% du normal). Le groupe est souvent considéré comme le groupe de patients les plus sévèrement atteints. Les patients sont déficients pour la GG et la TC-NER. Il existe deux classes de patients *XPA* : ceux qui sont hypersensibles aux UV et qui développent des cancers, et ceux qui présentent des troubles neurologiques en plus de ces symptômes. La plupart des patients présentent des symptômes dès la naissance ou dès les premiers mois de la vie.

Le groupe *XPA* est relativement hétérogène puisqu'il a été reporté des patients plus ou moins atteints. En effet, il existe quelques cas où les symptômes sont légers comme ce patient britannique (*XP8L0*) dont les fibroblastes présentent 30 % d'excision-resynthèse après une irradiation UV. Un patient égyptien (*XP13CA*) bien que présentant des capacités de réparation comparables aux autres *XPA* a un développement neurologique normal.

Etant donné l'importance du rôle que semble jouer la protéine *XPA* dans la réparation et les résultats quelques peu surprenants que nous avons obtenus, il est apparu essentiel d'aller plus loin dans la connaissance de ce groupe de complémentation. Ainsi, une partie est entièrement dédiée à *XPA* dans ce chapitre.

b) XPB

Pendant très longtemps, le groupe B s'est restreint à une seule patiente (XP11BE) décédée d'hypertension à l'âge de 33 ans. Deux jumeaux (XPCS1BA et XPCS2BA) souffrant d'une forme combinée XP/CS légère, sont venus compléter ce groupe B. Au total, trois catégories de patients XPB ont donc été recensées : une patiente présentant la combinaison XP/CS avec des symptômes assez sévères, les jumeaux avec des symptômes XP/CS mais cette fois-ci légers et deux autres jumeaux (TTD4VI et TTD6VI) présentant eux les symptômes associés au syndrome TTD (Oh *et al.*, 2007).

Même chez les patients XPB « légers », un retard dans le recrutement des facteurs de la voie NER (XPA, XPG, XPD et XPF) est observé, alors que chez le témoin sain, ce recrutement est immédiat après l'irradiation UV (Oh *et al.*, 2007). Les auteurs notent un retard dans le recrutement de XPD et surtout les cellules XPB « sévères » recrutent très difficilement XPF (retard de 3h par rapport au témoin). La région C terminale de XPB pourrait donc jouer un rôle dans l'incision en 5' (Evans *et al.*, 1997).

Certains patients XPB ont un phénotype XP/CS ce qui renforce l'idée du rôle clé de TFIIH au niveau du couplage réparation-transcription de l'ADN (de Laat *et al.*, 1999).

c) XPC

Avec le groupe A, le groupe C compte le plus grand nombre de malades. Les patients souffrent uniquement de problèmes de peau, il est très rare qu'ils développent des troubles neurologiques (Friedberg 2001; Lehmann 2003). Le niveau d'UDS varie entre 15 et 30 % : les cellules XPC sont moins sensibles à l'effet cytotoxique des UV et des produits chimiques carcinogènes que les autres groupes de complémentations. Le gène *XPC* est constitué de 33 kb (16 exons et 15 introns) ; il code pour une grosse protéine de 130 kDa. Comme nous l'avons vu précédemment la protéine XPC intervient uniquement dans la réparation des dommages situés dans les gènes non-transcrits. Ainsi XPC joue un rôle de reconnaissance du dommage uniquement dans la GG-NER. Le fait que la protéine ne soit pas impliquée dans la TC-NER expliquerait pourquoi les patients XPC ne développent pas de troubles neurologiques.

d) XPD

Le groupe D est très intéressant de part l'hétérogénéité des symptômes cliniques qu'il regroupe. Les patients XPD sont plus nombreux que les XPB. Le groupe D regroupe des

formes XP classiques, mais aussi des formes combinées XP/CS et des XP/TTD et des mutations dans le gène XPD conduisent à la trychothiodystrophie seule (Taylor *et al.*, 1997; Lehmann 2001). Ainsi ce groupe est très complexe. Les niveaux d'UDS sont extrêmement variables au sein de ce groupe et relativement élevés, entre 20 et 45 %, alors que les symptômes sont très graves (Lehmann 2001). Différentes mutations de ce gène conduisant à une déficience de la réparation par excision-resynthèse de nucléotides ont été caractérisées ; la majorité des mutations sont situées dans la partie C-terminale de l'hélicase. La protéine XPD interagit avec la sous-unité p44 de TFIIH, stimulant ainsi son activité hélicase 5'-3'. La plupart des mutations retrouvées chez les patients XPD et TTD sont situées dans la région codant pour ce domaine d'interaction. Alors que les domaines hélicases sont essentiels pour la NER ils ne le sont pas pour l'initiation de la transcription (Stary *et al.*, 2002). En effet, seule la présence physique de la protéine XPD compte pour la transcription.

e) XPE

Les patients du groupe E présentent des symptômes légers en comparaison avec les autres groupes ; ils ont un développement neurologique normal. Les patients XPE sont retrouvés en Europe et au Japon (Tang *et al.*, 2002). Le niveau d'excision-resynthèse mesuré par le test UDS est relativement élevé (>50 %). Ce niveau de réparation dans les cellules XPE complique le diagnostic puisque des confusions peuvent être faites avec la forme variante du XP ou avec un autre syndrome nommé « UV-sensitive syndrome ». Le facteur DDB (mis en cause chez les patients dits XPE) est une protéine hétérodimérique composée des sous-unités DDB1 (127kD) et DDB2 (48kD). Les patients XPE ont une mutation dans la partie codante pour DDB2 (Rapic-Otrin *et al.*, 2003).

f) XPF

Le sixième groupe de complémentation fut découvert en 1979 (Arase *et al.*, 1979). La plupart des patients du groupe F ont été identifiés au Japon (Matsumura *et al.*, 1998). Les enfants sont très sensibles au soleil mais les symptômes sont relativement légers comparés aux autres groupes de complémentation. L'apparition de cancer est assez tardive malgré un niveau d'UDS assez faible (15 à 30 %). Seulement deux patients présentent des déficiences neurologiques survenues tardivement.

g) XPG

Jusqu'en 1996, ce groupe de complémentation comprenait seulement 8 patients Européens et Japonais. Depuis, plusieurs autres enfants ont été diagnostiqués XPG et ce dans tous les continents du Monde. Les symptômes cliniques sont très variables suivant les patients : cela va de légers problèmes de peau à des formes beaucoup plus sévères associées à des graves troubles neurologiques. Comme TFIH, XPG aurait un rôle dans le couplage réparation-transcription de l'ADN (de Laat *et al.*, 1999). Certains patients du groupe G présentent des formes combinées XP/CS. Les mutations dans le gène *XPG* conduisant à une protéine XPG inactivée sont responsables de la forme XP seule, alors que les mutations conduisant à une protéine XPG en grande partie tronquée voire inexistante sont responsables de la forme combinée XP/CS. Le niveau UDS des formes combinées est très bas (2 %).

h) Cas particulier des XPV

Les patients XPV représentent 20 % des patients XP (Lehmann 2005). Comme les patients XP classiques, les patients du groupe variant souffrent également d'une hypersensibilité aux UV et d'une prédisposition accrue aux cancers cutanés (Kannouche *et al.*, 2003). Cependant, les patients XPV sont très rarement atteints de troubles neurologiques. Si les cellules XPV ne sont pas déficientes pour la NER (Cleaver 1972), elles le sont pour la synthèse translésionnelle (Svoboda *et al.*, 1998; Sary *et al.*, 2002).

Lors de la réplication, si la polymérase δ (aidée de la polymérase α et ϵ) arrive au niveau d'une lésion, la réplication s'arrête (Lehmann 2005). Ces polymérases sont incapables d'adapter leur site actif à la lésion (Steitz 1999). La synthèse translésionnelle permet alors de répliquer l'ADN outre la présence de cette lésion. Ceci est réalisé par les polymérases de la famille Y (Pol H, Pol I et Pol K). Ces polymérases sont moins stringentes que les polymérases classiques et leur site actif est plus ouvert permettant ainsi l'adaptation du site actif à la forme de la base lésée (Trincao *et al.*, 2001; Lehmann 2005). Ainsi, ces polymérases permettent de répliquer l'ADN mais la probabilité pour qu'elle fasse une erreur d'appariement est bien plus forte que pour les polymérases répliquatives classiques (1 % d'erreur *in vitro*).

La polymérase η responsable du XP variant a été isolée en 1999 (Masutani *et al.*, 1999). Les cellules XPV ont une activité d'excision-resynthèse mesurée lors du test UDS similaire à celle des cellules saines. Lorsque les cellules sont incubées avec de la caféine (1,5 mM) après l'irradiation UVC, elles présentent un niveau de réparation diminuée. Chez

les patients XPV, la synthèse translésionnelle ne pouvant utiliser la Pol η , la Pol ζ (zeta) va être recrutée (Nelson *et al.*, 1996) à la place de la polymérase répllicative bloquée au niveau du dommage. La Pol ζ est encore moins fidèle que la Pol η , à l'origine d'une forte probabilité d'erreur d'appariement lors de la polymérisation. Lorsque la lésion a été dépassée par la Pol η ou ζ , les polymérases répliquatives classiques reprennent leur activité de polymérisation. Les polymérases translésionnelles semblent moins processives que les polymérases classiques ce qui faciliterait leur décrochement de l'ADN quelques nucléotides après la lésion (Washington *et al.*, 1999).

B. Diagnostic et traitement

Le diagnostic du Xeroderma pigmentosum repose sur des observations cliniques de la peau, des yeux et de possibles manifestations neurologiques. Lorsque de jeunes enfants consultent pour une extrême réactivité suite à une exposition au soleil avec l'apparition de nombreuses tâches de rousseurs sur le visage, le médecin peut suspecter un cas de XP. Néanmoins, pour vérifier que les signes cliniques correspondent bien à cette maladie, et ne sont pas associées à un autre syndrome (comme la dyschromatose symétrique héréditaire dont les symptômes sont très ressemblants avec le XP), des tests sont ensuite réalisés dans des laboratoires de référence. Le but est de mesurer les capacités de réparation de l'ADN et ainsi de corréler les observations cliniques et la cause de la maladie c'est-à-dire la déficience pour la réparation. En France, le diagnostic « fonctionnel » de la maladie est réalisé à l'institut Gustave Roussy dans l'équipe du Pr. Alain Sarasin. Le test UDS est utilisé pour affirmer ou infirmer le soupçon de la maladie. Lorsque le test se révèle être positif, des tests supplémentaires sont entrepris pour déterminer le groupe de complémentation (A, B, C..., G ?). Le diagnostic XP est long (il faut compter environ 4 mois avant de pouvoir donner une réponse à la famille) et fastidieux puisqu'il faut dans un premier temps mettre en culture des fibroblastes à partir d'une biopsie de peau réalisée sur l'enfant, puis le test UDS en lui même demande plus d'une semaine. La recherche des mutations génomiques responsables de la maladie est ensuite possible par séquençage pour les gènes *XPA* et *XPC* mais n'est pas réalisée en routine pour les autres groupes de complémentation.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif du syndrome XP. Plusieurs dérivés du rétinoïde permettent de diminuer l'apparition de cancer de la peau. Malheureusement ce traitement n'est pas bien toléré sur une grande période donc les rétinoïdes oraux ne sont plus prescrits en France (source HAS, 2007) (Stary *et al.*, 2002).

Seule la photoprotection permet de diminuer le développement de complications chez les enfants XP. Une protection rigoureuse contre l'exposition aux rayonnements UV doit être assurée : usage intensif de crème solaire d'indice de protection maximal, pose de filtre anti-UV aux vitres des habitations et des voitures, port de vêtements longs couvrants toutes les parties du corps, port de lunettes de soleil (Lehmann 2003). A toutes ces mesures préventives drastiques (et onéreuses) s'ajoute le suivi régulier par un dermatologue afin de dépister le plus tôt possible d'éventuelles lésions pré-cancéreuses.

La recherche de nouvelles pistes thérapeutiques est en cours, la thérapie génique constitue vraisemblablement une piste sérieuse pour pouvoir, un jour, guérir ces enfants.

C. Revue sur XPA

1. Le gène XPA

Le gène *XPA* contient 6 exons et 5 introns et code pour un ARNm de 1,4 kb. L'expression de *XPA* est extrêmement faible dans les fibroblastes : 5 à 8 molécules d'ARNm codant pour la protéine XPA sont présentes dans chaque cellule (Layher *et al.*, 1997). Le promoteur du gène *XPA* est extraordinairement faible en comparaison avec d'autres gènes. Cela suggère donc qu'une petite quantité de protéine XPA serait suffisante pour que la réparation soit efficace. Les individus hétérozygotes pour ce gène (un allèle sauvage et un allèle muté) n'ont pas de phénotype particulier, appuyant ainsi l'hypothèse d'une faible quantité de protéine XPA suffisante dans la cellule (Moriwaki *et al.*, 2001).

2. La protéine XPA

a) La quantité de XPA

Des estimations par western blot (à l'aide d'un étalon constitué de la protéine XPA purifiée) montrent qu'il y aurait environ 150 000 molécules XPA par fibroblaste humain (Koberle *et al.*, 2006) et environ 200 000 dans les cellules HeLa (Araujo *et al.*, 2001). Une étude a montré que le nombre de molécules XPA dans les cellules tumorales de testicules est très faible (50 000 molécules/cellule) comparé aux cellules saines (Koberle *et al.*, 1999). Ainsi, la quantité de molécules XPA dépend du type cellulaire. Lorsque XPA est absente de la cellule (comme dans les cellules XP12ROSV), il n'y a pas de formation de complexe de pré-incision ce qui inhibe totalement ensuite l'excision du dommage. Quelle est alors la quantité limitante en XPA ?

Lorsque la quantité de XPA est réduite à 20-30 % de ce qui est habituellement retrouvé dans une cellule, il n'y a pas de différence de résistance aux UV de la souche *XPA*^{-/-}

par rapport au témoin (Muotri *et al.*, 2002; Koberle *et al.*, 2006). Comme nous l'avons déjà vu, les 6-4 PPs sont réparés beaucoup plus rapidement que les CPDs puisqu'au bout d'une heure les cellules témoins ont réparé 50% de ces dommages. Cependant, il n'y a plus de réparation des 6-4 PPs lorsque la quantité en XPA est inférieure à 10 000 molécules par cellule (Koberle *et al.*, 2006). Certaines études ont montré qu'une sur-expression de XPA entraîne une augmentation de la survie des cellules après une irradiation UV (Cleaver *et al.*, 1995) alors que d'autres études montrent que la sur-expression ne permet pas d'améliorer la résistance à l'irradiation UV (Muotri *et al.*, 2002). Si l'effet d'une sur-expression de XPA n'est pas clarifié, il semble toutefois il y ait une quantité limitante de XPA pour que la NER puisse avoir lieu de façon efficace.

Le renouvellement de la protéine XPA serait moins rapide que celui prévu par les calculs théoriques (Koberle *et al.*, 2006). De plus, il semblerait que seulement 30 % des molécules XPA soient transitoirement immobilisées au niveau du site lésé après une irradiation UVC de 16 J/m² (Rademakers *et al.*, 2003). Les raisons de cette limitation sont inconnues mais le fait est que toutes les molécules XPA ne sont pas disponibles pour la réparation. Cependant, rien n'est connu sur la proportion des autres protéines engagées dans la NER. Ainsi, cette disponibilité restreinte n'est peut-être pas spécifique à XPA. La protéine XPA a une longue demie-vie, elle forme des complexes très stables avec les autres facteurs de la NER. De ce fait, peu de protéines XPA suffisent pour que la réparation ait lieu.

b) La localisation de la protéine XPA

XPA aurait une localisation majoritaire dans le cytoplasme et pénétrerait dans le noyau après un stress génotoxique pour réparer l'ADN (Fung *et al.*, 2008). Ainsi, après une irradiation UV, la phosphorylation par ATR de la protéine XPA au niveau de la sérine 196 modulerait l'activité de XPA (Wu *et al.*, 2006) et la régulation par ATR permettrait également la translocation de la protéine XPA du cytoplasme vers le noyau (Wu *et al.*, 2007). La quantité de XPA n'augmente pas après l'irradiation UV, la protéine est uniquement adressée vers le noyau pour que la réparation puisse avoir lieu (Wu *et al.*, 2007). La protéine XPA possède une séquence NLS (Nuclear Localization Sequence) : l'interaction de XPA au niveau de cette séquence d'adressage avec des protéines de transport permettrait le passage de XPA

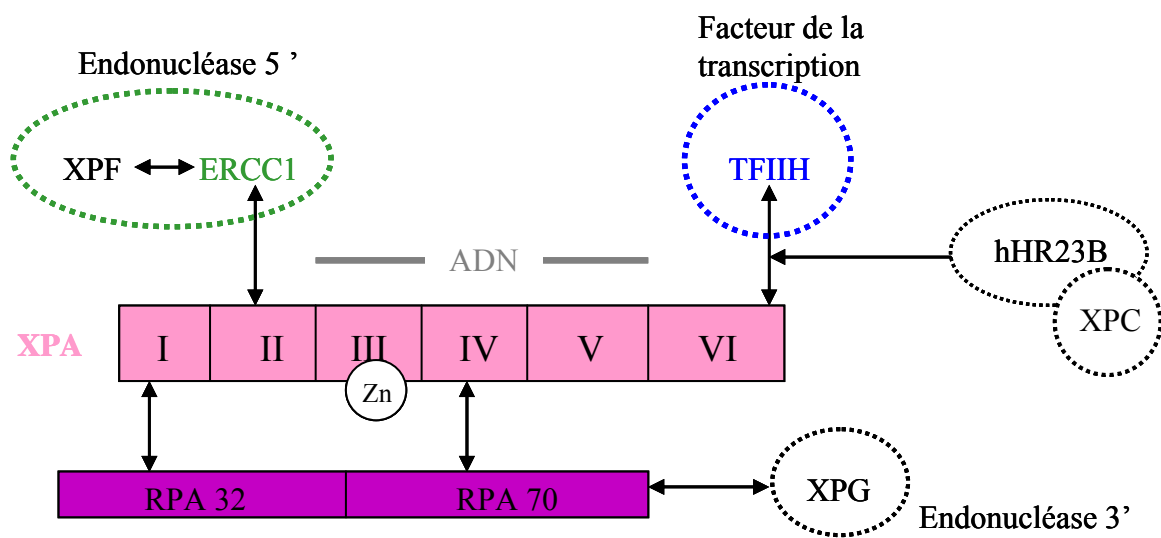


Figure 24: Les différents domaines de la protéine XPA et les différentes interactions de XPA avec les autres protéines de la NER. Adapté de Cleaver *et al.*, 1997

du cytoplasme vers le noyau. Par exemple, l'interaction avec XAB1 permettrait l'adressage de la protéine vers le noyau (Nitta *et al.*, 2000).

c) Les différents domaines de la protéine

XPA est une protéine à doigt de zinc de 31 kDa (273 acides aminés) qui interagit avec l'ADN au niveau de la région centrale (codée par les exons III, IV et V) (**Figure 24**). Il se crée des interactions hydrophobes entre XPA et les bases aromatiques anormalement exposées à la surface de l'hélice (Batty *et al.*, 2000b). Le doigt de zinc, codé par l'exon III, est retrouvé au niveau du domaine central de la protéine (Bartels *et al.*, 2007) ; il contient 4 cystéines. Ce doigt de zinc ainsi que le domaine d'interaction avec ERCC1 apparaissent très importants pour que XPA puisse agir en tant que facteur processif (Bartels *et al.*, 2007). Cette propriété est particulièrement nécessaire lorsque l'ADN est présent sous forme de nucléosome (Feng *et al.*, 1997).

XPA présente une faible affinité pour l'ADN (10^5 - 10^6 M⁻¹) comparativement à d'autres facteurs de la NER comme XPC ou DDB2. Cependant, XPA a une meilleure affinité pour l'ADN double brin par rapport au simple brin (Robins *et al.*, 1991; Batty *et al.*, 2000b; Hermanson-Miller *et al.*, 2002) et se fixe préférentiellement sur de l'ADN endommagé par rapport à de l'ADN intact comme le montre les expériences de retard sur gel (*mobility shift assay*) (Jones *et al.*, 1993; Camenisch *et al.*, 2007) et de photoblanchiment (Rademakers *et al.*, 2003). Il a aussi été montré que 4 h après une irradiation UV, la protéine XPA est insoluble ; il est très difficile de l'extraire avec un protocole classique de lyse cellulaire ce qui suggère que la protéine est fixée sur la matrice nucléaire (Svetlova *et al.*, 1999). La reconnaissance est également différente suivant le type de lésion. En effet, XPA fixe les 6-4 PPs avec une meilleure efficacité que les CPDs. Cette affinité préférentielle est à relier à la différence de distorsion de la double hélice engendrée par ces deux lésions : les 6-4 PPs modifient plus la structure de la double hélice que les CPDs. La région en doigt de zinc permettrait la fixation à l'ADN lésé et la partie C-terminale de fixation à l'ADN pénétrerait entre les deux brins au niveau de la «bulle» formée par le dommage (Cleaver *et al.*, 1997). Ainsi, selon ce modèle, XPA posséderait deux domaines de lésions à l'ADN. XPA serait ancrée à l'ADN par le doigt de zinc et la lésion serait, elle, fixée par les régions correspondant aux exons IV et V (Figure 25). La reconnaissance du dommage par XPA est indépendante de la présence d'ATP ou de l'hydrolyse de l'ATP (Li *et al.*, 1998). Deux résidus lysine (aux positions 141 et 179) semblent très importants pour la fixation de XPA par des interactions électrostatiques avec l'ADN (Camenisch *et al.*, 2007).

XPA peut former un homodimère (Yang *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005). La formation de ce dimère serait modulée par la concentration de XPA dans la cellule, une forte concentration en protéine favorisant l'assemblage en dimère.

La protéine XPA interagit avec l'ADN lésé mais également avec d'autres protéines de la NER comme RPA, TFIIH et ERCC1 (Figure 24) comme nous le verrons par la suite. XPA est capable d'interagir également avec CSB (Selby *et al.*, 1997a) ainsi qu'avec la sous-unité p34 de TFIIIE (Park *et al.*, 1995). TFIIIE n'a pas de rôle défini dans la réparation.

3. Les différentes mutations dans le gène XPA

a) Les mutations retrouvées chez les patients XPA

Différentes mutations dans le gène XPA ont été recensées. Suivant la position et le type de mutation, le phénotype associé est plus ou moins sévère. Ainsi ce groupe de complémentation présente une hétérogénéité génotypique et phénotypique tout comme les autres groupes de complémentation.

Les patients XPA les plus sévèrement atteints présentent des mutations homozygotes (sur les deux allèles) dans la région du gène qui permet la fixation de la protéine XPA à l'ADN (domaine central : exons III, IV et V) (Bartels *et al.*, 2007). La mutation du gène XPA la plus fréquente chez les patients Japonais porte sur l'intron III modifiant l'épissage alternatif de l'ARNm ce qui conduit à une protéine XPA tronquée et non-fonctionnelle. Les mutations des patients XP Japonais portent également sur l'exon VI (codon 228 STOP à la place d'une arginine : souche XP39OS) ou sur l'exon III (codon 116 STOP à la place d'une tyrosine) (Satokata *et al.*, 1992). Les patients XP12RO (correspond à un patient palestinien) et XP25RO ont une mutation non-sens dans l'exon V (Bartels *et al.*, 2007) : Le codon 207 code pour un STOP au lieu d'une arginine. Ces patients n'expriment pas la protéine XPA (pas de détection de la protéine chez ces patients par western blot) et ne peuvent réparer les photoproduits (Kobayashi *et al.*, 1998). Ils sont extrêmement sensibles aux UV et le test UDS donne une réparation quasi-nulle. Il existe un révertant de la souche XP12RO, nommé XP129, qui exprime en quantité réduite la protéine XPA fonctionnelle par rapport au témoin (Jones *et al.*, 1992). Dans les cellules XP129, le codon STOP 207 est muté et code alors pour un acide aminé. La protéine résultante XPA a une taille normale mais elle est présente dans la cellule en quantité moindre par rapport à la protéine XPA issue du gène natif. Chez ce révertant, la réparation des 6-4 PPs est normale.

Il existe des patients moins atteints où la mutation est généralement en dehors de la région de fixation à l'ADN. C'est le cas par exemple de patients Tunisiens où la mutation est

située dans l'exon VI. D'autres patients XPA « légers » présentent une mutation qui provoque lors de l'épissage alternatif une production d'une faible quantité de protéine XPA normale (Mimaki *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996; Lehmann 2003; Sidwell *et al.*, 2006). Comme nous l'avons vu précédemment, une quantité diminuée de protéine XPA n'entraîne pas forcément une hypersensibilité des cellules aux radiations UV.

Pour résumer, une mutation dans le domaine central conduit à une réparation des CPDs très faible par rapport au témoin. Néanmoins, une faible quantité de protéine XPA fonctionnelle permet la restauration d'une activité de réparation presque comparable à celle du témoin (révertant XP129). Les mutations dans le domaine de fixation à TFIIH (délétion de 46 acides aminés en C-terminal de XPA, une arginine à la place d'une histidine au niveau du codon 244 et une sérine à la place d'une cystéine au niveau du codon 264) conduisent à des phénotypes de réparation variables (Kobayashi *et al.*, 1998). Une mutation dans le domaine de fixation à la sous-unité p32 de RPA (délétion de 36 acides aminés en N-terminal de XPA) affecte partiellement la réparation alors qu'une mutation dans le domaine d'interaction avec ERCC1 (délétion des acides aminés 78 à 84) a pour conséquence une très forte diminution du niveau de réparation (comparable à ce qui est obtenu avec XP12RO).

Les patients avec les troubles neurologiques sévères sont ceux qui ont des mutations dans les exons III et IV, ainsi que dans l'exon V (perte totale de la fonction protéique). Les enfants atteints de faibles désordres neurologiques présentent des mutations permettant l'expression d'une protéine XPA partiellement fonctionnelle (insertion de nucléotides ou mutations ponctuelles dans l'exon VI) (Cleaver *et al.*, 1997).

b) Le modèle murin XPA

Les souris mutées pour XPA ($XPA^{-/-}$) sont créées par introduction d'une cassette neo à la place des exons III et IV du gène XPA (domaines de liaison à l'ADN) (de Vries *et al.*, 1996; Berg *et al.*, 1997). La souris se développe normalement et est fertile ; il n'y a pas d'augmentation de la mortalité. Comme chez les humains, les souris hétérozygotes $XPA^{+/-}$ ne présentent pas de phénotype particulier, il n'y a pas une incidence accrue d'apparition de cancer (Berg *et al.*, 1997). Les souris $XPA^{-/-}$ non exposées aux UV présentent une faible incidence d'adénome hépatocellulaire ce qui suggérerait une impossibilité de réparer les dommages causés par des facteurs endogènes tels que les ERO (de Vries *et al.*, 1996).

	Homme	Souris
REPARATION		
Réparation résiduelle	2%	5%
Sensibilité des cellules aux UV	+	+
Sensibilité des cellules aux agents génotoxiques	+	+
CLINIQUE		
Sensibilité aux UV	+	
Augmentation de l'incidence d'apparition de cancer cutané	+	
Augmentation de l'incidence d'apparition de tumeurs internes	+/-	+/-
Problèmes oculaires	+	+
Troubles neurologiques	+	-

Tableau 5 : Comparaison des symptômes entre l'Homme et la Souris

Cependant, les souris $XPA^{-/-}$ ne souffrent pas de troubles neurologiques (pas de neurodégénérescence observée sur les coupes de tissus de cerveau) (Niedernhofer 2008). Cette observation constitue une différence majeure avec le modèle humain, où les enfants XPA peuvent dans certains cas développer des troubles neurologiques très graves. Comme chez les patients humains, les souris $XPA^{-/-}$ développent des maladies de l'œil et les souris irradiées aux UV montrent une forte suppression du système immunitaire. Les fibroblastes de ces souris mutées dans XPA sont très sensibles aux agents génotoxiques (UV, benzo[a]pyrène, NA-AAF), mais ils montrent une plus grande sensibilité pour les UV que pour les autres agents génotoxiques. Le test UDS réalisé sur les fibroblastes $XPA^{-/-}$ donne 5% de réparation après une dose de 16 J/m², ce qui est sensiblement équivalent au niveau obtenu chez l'Homme (Koberle *et al.*, 2006). Les souris $XPA^{-/-}$ sont plus sensibles que les saines pour le développement de tumeurs internes. Néanmoins, la différence de sensibilité est bien plus importante en ce qui concerne les tumeurs de la peau. Il a été estimé que le gène XPA murin confère « un facteur de protection » de 60 fois contre la carcinogénicité due aux UV (Lehmann 2003). Ce facteur est beaucoup plus faible chez la Souris par rapport à l'Homme puisqu'on estime que les patients XP ont un risque 1000 fois plus élevé que la population saine de développer des cancers de la peau. Le tableau ci-contre compare le modèle humain avec le modèle murin (**Tableau 5**). Hormis la différence pour les désordres neurologiques, le modèle murin reflète bien ce qui se passe chez les patients XPA.

4. Le ou les rôle(s) de XPA

a) Le rôle établi

La fonction précise de cette protéine reste assez mystérieuse, il semblerait qu'elle ait un rôle polyvalent lors de la NER. Les patients XPA sont déficients à la fois pour la GG et la TC-NER ce qui les différencie des patients XPC et XPE (Kobayashi *et al.*, 1998). Alors que les activités NER peuvent être reconstituées *in vitro* sans DDB2 (Kazantsev *et al.*, 1996) ou sans XPC (Mu *et al.*, 1996), la protéine XPA est toujours indispensable à l'excision (Evans *et al.*, 1997; Mu *et al.*, 1997b). De plus, XPA est présent dans le complexe final d'incision alors que le facteur XPC est relargué au moment où les endonucléases se fixent sur l'ADN. Contrairement à TFIIH ou RPA, XPA ne semble pas être impliquée dans d'autres voies métaboliques de l'ADN comme la recombinaison, la transcription ou la réplication.

La protéine XPA a une meilleure affinité pour l'ADN double brin lésé que l'ADN non lésé, suggérant ainsi son implication dans une étape précoce de reconnaissance du dommage. Il est aussi plausible que XPA interagisse avec d'autres protéines de la NER pour initier le

processus d'incision. Nous allons donc étudier son rôle dans les étapes précoces et tardives de la NER.

i. Etape précoce de la NER : reconnaissance du dommage

Comme nous l'avons vu précédemment, XPA présente une certaine affinité pour les lésions UV induites. C'est cette caractéristique qui fut à l'origine de l'hypothèse du rôle majeur de XPA dans la reconnaissance du dommage lors de la GG-NER. Lorsque la protéine XPC fut définie comme étant le premier facteur intervenant dans la voie GG-NER, le rôle de XPA fut reconsidéré (Costa *et al.*, 2003). XPA interagit avec deux autres protéines : XAB 1 et XAB 2 (XPA Binding Protein). XAB1 est une GTPase impliquée dans la localisation nucléaire de XPA alors que XAB2 jouerait un rôle dans la TC-NER. L'exon VI du gène XPA code pour un domaine de fixation avec TFIIH, ce qui implique la protéine XPA dans les étapes initiales de la NER, à savoir le déroulement de la double hélice. TFIIH interagissant avec hHR23B/XPC, la protéine XPA sert donc de point d'ancrage pour les étapes suivantes de la NER. XPA interagit également avec RPA : ce complexe est nécessaire pour la formation du complexe de pré-incision (Li *et al.*, 1995a). Il aurait un rôle de « vérificateur » de la distorsion de l'ADN et du bon déroulement de la double hélice. Le complexe vérifierait également l'assemblage correct des facteurs de la voie NER (Missura *et al.*, 2001).

ii. Etape tardive de la NER : excision du dommage

Grâce aux associations que réalise XPA avec d'autres facteurs (RPA, ERCC1), cette protéine joue un rôle très important dans le recrutement des endonucléases XPG et XPF au niveau du brin endommagé et donc dans l'étape d'excision du dommage (Cleaver *et al.*, 1997). Les endonucléases XPF et XPG localisent le site endommagé de l'ADN selon un mécanisme processif (comme les polymérases répliquatives) (Feng *et al.*, 1997). Un mécanisme d'action processif augmente l'efficacité d'interaction d'une protéine avec son substrat et accélère la reconnaissance de la cible. Une protéine peut agir de façon processive par elle-même ou ce caractère processif peut être conféré par une autre protéine. Par exemple, la protéine XPA confère son mécanisme d'action processif aux nucléases XPF et XPG (Lambert *et al.*, 2000; Bartels *et al.*, 2007). Dans les cellules XPA^{-/-}, les endonucléases agissent selon un mécanisme distributif ou moins processif (Feng *et al.*, 1997) et sont incapables d'inciser le brin endommagé dans une structure nucléosomale.

XPA associé à RPA jouerait le rôle de chef d'orchestre de la NER, vérifiant la présence de la lésion et s'assurant du bon déroulement de la suite de la NER. Le complexe formé par les deux facteurs XPA et RPA semble former un socle pour le recrutement des différents facteurs de la NER et oriente également l'action des nucléases au niveau du brin endommagé (de Laat *et al.*, 1998). Ainsi, XPA semble être une protéine clé de la NER mais sa fonction n'est pas encore entièrement élucidée (Bartels *et al.*, 2007).

b) Les interactions de XPA avec les autres protéines de la NER : vers de nouveaux rôles ?

i. Association de XPA avec TFIIH

Contrairement à XPA qui se fixe préférentiellement sur l'ADN endommagé, TFIIH présente une affinité équivalente pour l'ADN lésé et non lésé (Nocentini *et al.*, 1997). Il a été démontré lors d'un test *in vitro*, le rôle de XPA dans la fixation stable de TFIIH au niveau des photoproduits (Nocentini *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998). TFIIH interagit avec le domaine C-terminal de XPA et cette interaction est dépendante du nombre de lésions présentes sur l'ADN. Le mécanisme proposé est le suivant : XPA recrute TFIIH et l'empêche ainsi d'assurer sa fonction au niveau des promoteurs pour la transcription. TFIIH interagit directement avec XPA lié au dommage. Une fois intégré au complexe de pré-incision, TFIIH se lie alors à l'ADN par ses sous-unités p44 et p34. Enfin, par l'intermédiaire des sous-unités hélicases ATP dépendantes (XPB et XPD), l'ADN est déroulé aux environs de la lésion (Nocentini *et al.*, 1997). Ce rôle de XPA dans le recrutement de TFIIH contredit ce qui a été admis précédemment à savoir le recrutement de TFIIH par le complexe hHR23B/XPC (Yokoi *et al.*, 2000; Araujo *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2007). Ainsi quel est l'ordre de recrutement ? Est-ce d'abord XPA puis TFIIH ou l'inverse ? Ces expériences aux résultats contradictoires soulignent la complexité de la voie NER : cette voie de réparation doit être envisagée comme un système modulable en fonction du cycle cellulaire et de la lésion considérée. Les protéines XPA, RPA, XPC et TFIIH semblent plutôt agir de façon coopérative (Reardon *et al.*, 2004), chaque liaison d'une protéine sur l'ADN endommagé potentialise la fixation des autres facteurs.

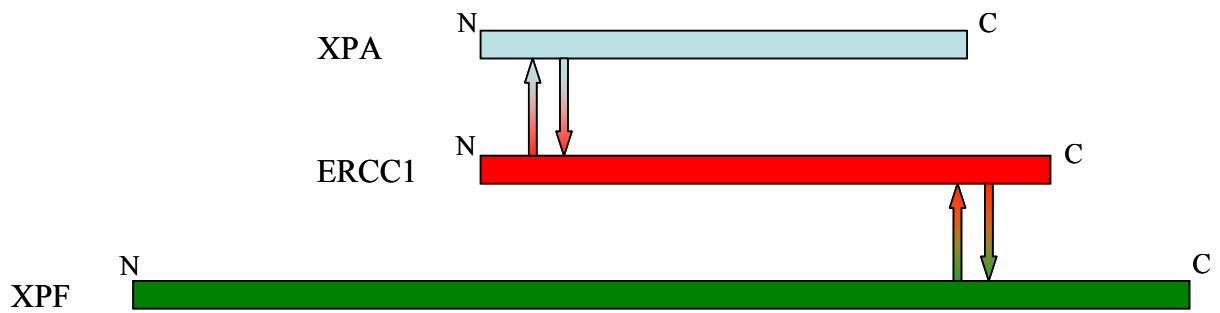


Figure 25: Le complexe ternaire XPA/ERCC1/XPF

L'extrémité N-terminale de XPA interagit avec l'extrémité N-terminale de ERCC1 et
l'extrémité C-terminale de ERCC1 interagit avec l'extrémité C-terminale de XPF

ii. Association de XPA avec ERCC1

La région codée par l'exon II est essentielle pour l'interaction de XPA avec ERCC1 *in vivo* et *in vitro* (Li *et al.*, 1994; Tsodikov *et al.*, 2007). ERCC1 est le cofacteur de l'endonucléase XPF ; cette interaction XPA/ERCC1 est donc essentielle pour le chargement de XPF/ERCC1 au niveau du dommage et est donc indispensable à l'étape d'incision. Deux mutants de délétion ont été créés au niveau de l'exon II (ΔG : Gly 72 - Phe 75 et ΔE : Glu78 – Glu84) (Li *et al.*, 1995b). Le mutant XPA ΔE est capable d'interagir avec ERCC1 mais l'interaction est très largement diminuée par rapport au sauvage (70% de réduction). Le mutant XPA ΔG n'interagit pas avec ERCC1. Les deux mutants sont incapables de compléter des lysats XPA^{-/-} pour la réparation de l'ADN; l'interaction XPA/ERCC1 est donc nécessaire pour la réparation. *In vivo*, ces mutants ne présentent pas de défaut de liaison à l'ADN lésé (Li *et al.*, 1995b) ; le complexe de pré-incision peut donc se former mais la voie NER est bloquée à l'étape d'incision par les endonucléases. La demi-vie de l'interaction XPA/ERCC1 a été déterminée : elle est de 90 min ce qui signifie que l'interaction est très stable. L'interaction entre les deux protéines est hydrophobe puisque l'affinité du complexe augmente en fonction de la concentration en sel (Li *et al.*, 1995b). En conclusion, ce domaine de la protéine XPA est important pour la réparation puisque ERCC1 permet de faire le lien entre XPA et XPF. Il y a formation d'un complexe ternaire XPA/ERCC1/XPF où l'extrémité N-terminale de XPA interagit avec l'extrémité N-terminale de ERCC1 et l'extrémité C-terminale de ERCC1 interagit avec l'extrémité C-terminale de XPF (Park *et al.*, 1994) (**Figure 25**). Si la protéine XPA est indispensable pour la fixation de XPF au niveau du brin endommagé, elle ne l'est pas pour la liaison de l'autre endonucléase (XPG) (Oh *et al.*, 2007). L'interaction avec ERCC1 permettrait de renforcer « le contrôle qualité » de l'excision (Tripsianes *et al.*, 2007). XPF possède l'activité catalytique pour inciser le brin et ERCC1 garantit de la spécificité de cette activité endonucléasique. Tout ceci dans le but d'éviter des coupures intempestives de l'ADN.

iii. Association de XPA avec RPA

La protéine RPA (Replication Protein A), aussi appelée HSSB (Human Single Stranded DNA Binding protein) est un complexe protéique constitué de 3 sous-unités : p70 (RPA-70, activité de fixation à l'ADN simple brin), p32 (RPA-32) et p14 (RPA-14) (Fanning *et al.*, 2006). RPA joue un rôle important dans les « 3R » du métabolisme de l'ADN

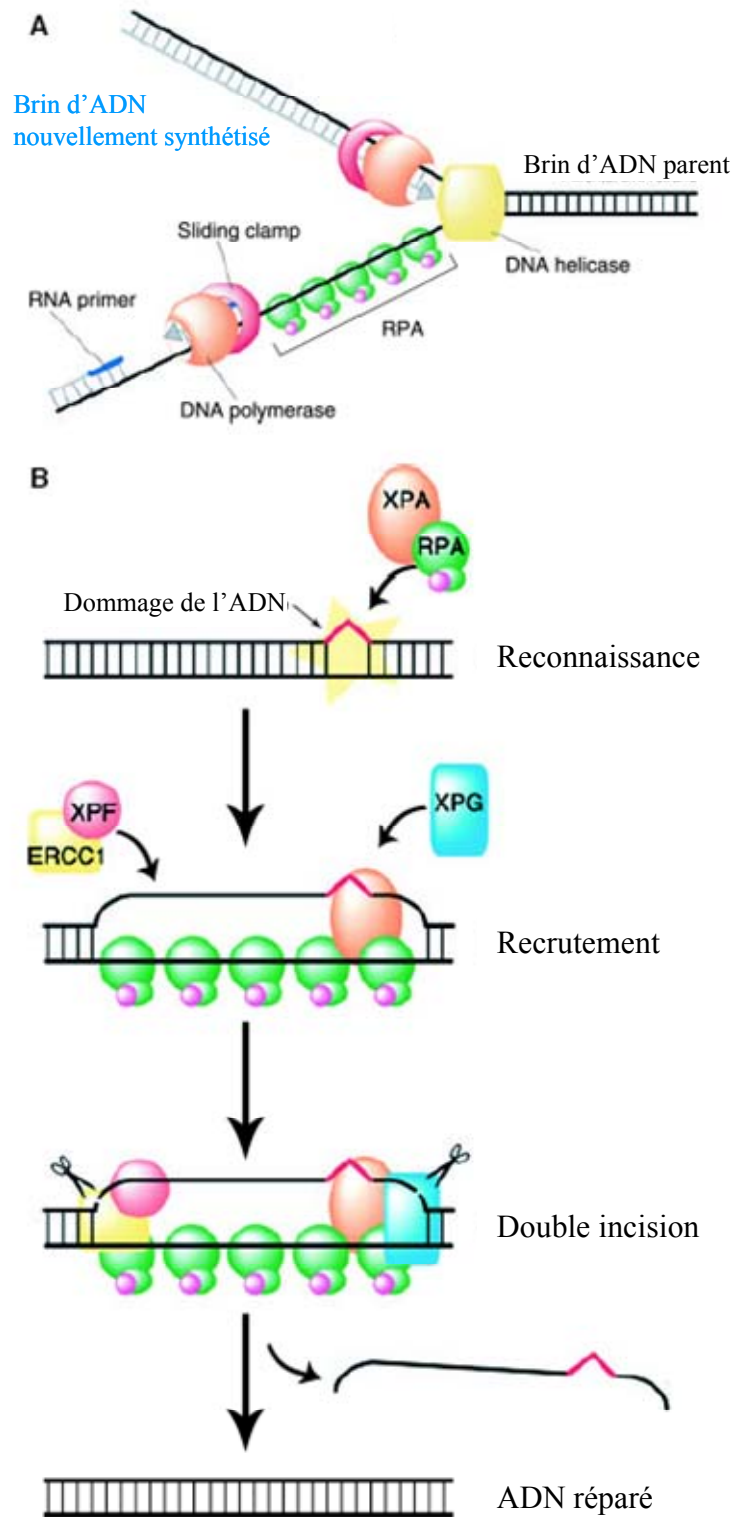


Figure 26: Le rôle de RPA lors de la réplication de l'ADN (A) et de la réparation par la voie NER (B)

(Réplication, Recombinaison et Réparation) (**Figure 26**). Le rôle de RPA au niveau de la réparation était attendu au niveau des étapes tardives de polymérisation, et à la surprise des chercheurs, RPA joue également un rôle dans l'étape d'incision de la voie NER. RPA peut interagir avec d'autres facteurs de la NER (XPA, XPG et XPF) (He *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995a). Ainsi ce facteur a un rôle très important lors de la NER puisque cette protéine est présente dès la reconnaissance du dommage jusqu'à la resynthèse de l'ADN. C'est un facteur de la NER à part entière.

XPA interagit avec les sous-unités 70 (exon IV) et 32 (exon I) de RPA *in vivo* et *in vitro* (Li *et al.*, 1995a). Une mutation dans le gène XPA au niveau de la région d'interaction avec RPA-70 inhibe toute interaction entre les deux protéines, et l'activité de réparation est fortement diminuée *in vitro* et *in vivo* (Li *et al.*, 1995a). Une mutation dans la région d'interaction avec RPA-32 n'inhibe pas totalement la réparation, celle-ci étant juste diminuée. La sous-unité p70 est donc essentielle à la NER ; la mutation dans la région de fixation à p32 aurait plutôt un effet sur la localisation sub-cellulaire de XPA puisque cette région code aussi pour la séquence d'adressage de la protéine (NLS). RPA joue un rôle dans la reconnaissance du dommage puisqu'il a été montré une certaine affinité de RPA pour un duplex d'ADN contenant un photoproduit (Burns *et al.*, 1996). Le complexe XPA/RPA semble avoir une meilleure affinité pour l'ADN lésé que la protéine XPA seule (Li *et al.*, 1995a; Missura *et al.*, 2001). Plus précisément, RPA se fixe à l'ADN simple brin non endommagé (Hermanson-Miller *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003) et stimule la reconnaissance du brin endommagé en interagissant avec XPA (Vasquez *et al.*, 2002). La sous-unité p70 de RPA contient trois régions de fixation à l'ADN ce qui permet à la protéine de recouvrir l'ADN sur environ 30 nucléotides autour de la lésion (Costa *et al.*, 2003). RPA fixe ainsi l'ADN simple brin sur une longueur correspondant au fragment excisé par les endonucléases ; cela permettrait de stabiliser la structure hélicoïdale déroulée au niveau de la lésion et permettrait également de protéger le brin non endommagé d'une attaque nucléasique intempestive. RPA reconnaît même une triple hélice d'ADN sans le concours de XPA (reconnaissance d'une distorsion de l'hélice) (Vasquez *et al.*, 2002). D'autres expériences ont montré qu'un lysat protéique de cellules HeLa excise un adduit cisplatine : cet adduit est reconnu par RPA alors que XPA est incapable de s'y fixer (Gentile *et al.*, 2003). Ainsi cela suggérerait que RPA peut se substituer à XPA pour la reconnaissance et la fixation du dommage. Cependant, lorsque XPA est absent, RPA forme de gros agrégats sur l'ADN ; XPA permettrait donc d'améliorer la spécificité de la fixation de RPA au niveau de lésions de l'ADN (Vasquez *et al.*, 2002).

Si le rôle majeur de RPA lors de la NER consiste à former un socle pour stabiliser les autres facteurs et permettre ensuite l'arrivée des polymérases, RPA aurait également une activité hélicase lors de la réplication de l'ADN (Georgaki *et al.*, 1992). Des expériences sur de l'ADN isolé montrent que XPA inhibe l'activité hélicase de RPA (Missura *et al.*, 2001). XPA régulerait ainsi négativement le déroulement de l'ADN afin de limiter la taille du fragment excisé à une taille « standard » d'environ 30 nucléotides. Enfin, RPA joue également un rôle dans l'étape d'excision du fragment endommagé puisqu'il coordonne l'action des endonucléases en interagissant avec XPG et XPF-ERCC1 (de Laat *et al.*, 1998).

En conclusion, RPA associé à XPA participe à la reconnaissance du dommage, il assure aussi une protection du brin non lésé et permet de recruter les facteurs nécessaires à la resynthèse de l'ADN (Costa *et al.*, 2003). RPA semble jouer un rôle très important dans la NER de par son implication dans toutes les étapes du système de réparation. RPA intervient très tôt dans le processus de réparation pour stabiliser le complexe de pré-incision constitué de XPC-TFIIH et XPA. Il permettrait le bon déroulement de l'ADN. Puis RPA permet la stabilisation des endonucléases au niveau du brin endommagé et joue donc un rôle lors de l'excision de la lésion. Enfin RPA est le seul facteur qui participe à la fois à l'excision du dommage et à la resynthèse de l'ADN. L'interaction forte de RPA avec XPA relie cette dernière protéine aux différentes étapes de la NER. Il pourrait être envisagé l'implication de XPA dans les étapes tardives de resynthèse de l'ADN.

En conclusion de cette revue sur XPA, il apparaît que le rôle de XPA est peut-être plus complexe que ce qui est décrit généralement dans la littérature. XPA semble être un facteur très important pour la voie NER, en jouant un rôle lors de la reconnaissance du dommage en tant que « vérificateur » de la présence de la lésion, puis en favorisant le recrutement des autres facteurs de la NER et stabilisant le complexe de pré-incision. Néanmoins, XPA réalise de nombreuses interactions avec d'autres facteurs de la NER, et il ne peut être exclu un rôle plus complexe de XPA. Cette protéine pourrait agir en tant que régulateur négatif, comme nous l'avons vu à propos de l'inhibition de l'activité hélicase de RPA, mais également son rôle sur la processivité des endonucléases font de XPA un facteur clé de la NER dont le mécanisme d'action précis n'est pas encore clarifié.

IV. Méthodes pour étudier la réparation de l'ADN

Il existe plusieurs méthodes pour détecter les lésions présentes dans l'ADN. Ces méthodes comprennent entre autre le test comète, l'élution alcaline, la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (CLHP-SM/SM), ou encore l'utilisation d'anticorps dirigés contre des lésions de l'ADN. En observant la disparition des lésions, il est possible lors de cinétique de mesurer la réparation. Dans cette partie, nous allons nous intéresser à quelques méthodes permettant soit d'appréhender la réparation sous un angle mécanistique, par des techniques d'imagerie ou par l'utilisation d'un système reconstitué de protéines de réparation, soit de mesurer quantitativement des activités enzymatiques de la réparation, grâce à des tests *in vivo* et *in vitro*.

A. Techniques d'imagerie : regarder la distribution des protéines de réparation

Plusieurs techniques d'imageries ont été développées et sont employées pour étudier les mécanismes de la réparation de l'ADN. L'objectif de ces techniques est d'obtenir une information sur la localisation cellulaire des protéines de la réparation. Par exemple, les méthodes de micro-irradiation consistent à placer un filtre en polycarbonate, contenant des pores de quelques micromètres de diamètre (3 μm), entre les cellules et la lampe UV (Katsumi *et al.*, 2001). Le but est de créer ainsi des foyers d'irradiation, c'est-à-dire que seules certaines zones du noyau sont irradiées. Il est possible de localiser *in situ* les dommages formés par l'irradiation UV en utilisant un anticorps spécifique d'un type de dommage (Anticorps anti-CPDs ou anti-64 PPs). Cette technique d'imagerie permet ensuite de visualiser le recrutement des différentes protéines de la réparation au niveau de ces foyers en utilisant un anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt.

Les techniques d'imagerie FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) et FLIP (Fluorescence Loss Induced by Photobleaching) sont des techniques d'imagerie permettant de visualiser en temps réel le mouvement de facteurs d'intérêt directement dans la cellule (Feuerhahn *et al.*, 2008). Ces techniques peuvent être utilisées pour étudier la mobilité des molécules membranaires et intracellulaires, les interactions moléculaires, les échanges entre les compartiments cellulaires (trafic nucléo-cytoplasmique) ou les interactions cellulaires (jonctions gap). Les techniques de FLIP et FRAP permettent

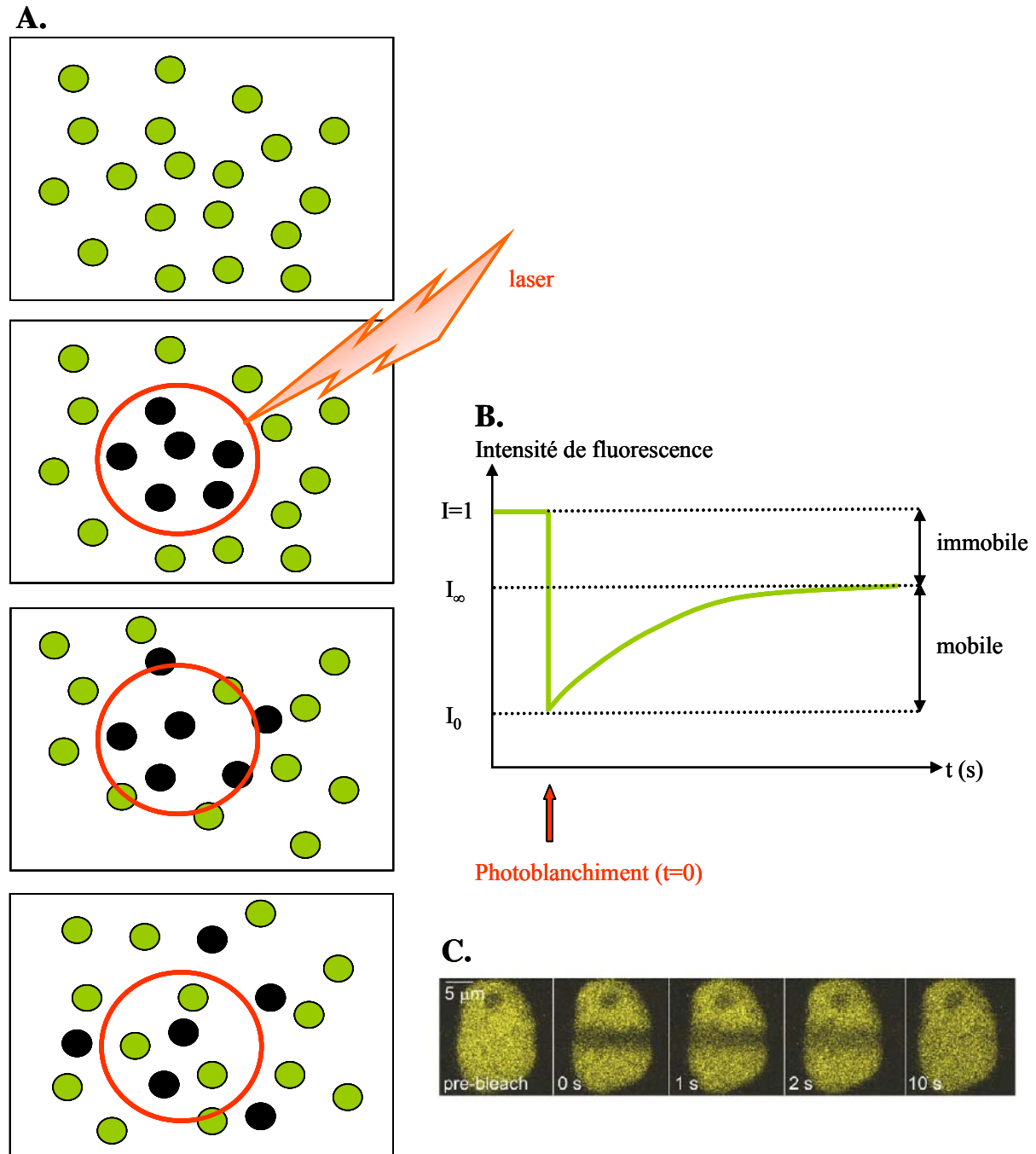


Figure 27: La récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)

A/ Le principe de la méthode. Les cercles verts correspondent à une protéine de la réparation marquée de façon fluorescente avec la GFP. Le laser blanchit une zone précise de la cellule: les molécules perdent leur fluorescence (cercle noir). En regardant au microscope la zone qui a été photoblanchie, il est possible de quantifier le retour de la fluorescence dû au mouvement de la protéine de réparation en question. **B/** La courbe d'intensité de fluorescence en fonction du temps. **C/** Les images montrant la récupération de la fluorescence

d'accéder à des informations quant à la dynamique moléculaire. C'est le principal avantage par rapport aux techniques d'imagerie classique utilisant la fluorescence où seul un état statique peut être visualisé (Koster *et al.*, 2005). Les techniques de photoblanchiment utilisent la fluorescence pour marquer de façon spécifique une protéine d'intérêt ; les protéines sont rendues fluorescentes par la fusion de la protéine d'intérêt par exemple avec la GFP. Dans notre cas, le photoblanchiment est dirigé contre les facteurs de la réparation. La stratégie est de perturber le système en faisant disparaître la fluorescence par un flash lumineux très puissant dirigé sur une zone précise. Le photoblanchiment est un processus irréversible, c'est-à-dire que la protéine marquée exposée à la lumière du laser ne pourra plus jamais fluorescer (Koster *et al.*, 2005). Après le blanchiment, les molécules fluorescentes et blanchies se redistribuent dans l'espace à une vitesse « V », dépendante de la constante de diffusion propre à chaque molécule (fonction de la taille). Le mouvement de la protéine fluorescente d'intérêt est suivi grâce à la microscopie confocale. Si la molécule d'intérêt est capable de se déplacer dans le milieu lors de l'expérience, la technique FRAP observe le retour de la fluorescence dans une zone préalablement blanchie (**Figure 27**) alors que la technique FLIP nécessite des blanchiments répétitifs pour voir disparaître la fluorescence dans une zone donnée (**Figure 28**). L'analyse de la cinétique de récupération de fluorescence (FRAP) permet de déduire le coefficient de diffusion latérale « D », caractéristique de la vitesse de déplacement des molécules dans le milieu (plus la vitesse de diffusion est élevée plus la fluorescence augmente rapidement). La technique FLIP est idéale pour étudier le trafic d'une protéine entre deux compartiments (par exemple le noyau et le cytoplasme) (Koster *et al.*, 2005).

Dans le cas de la réparation de l'ADN, les cellules peuvent être au préalable traitées pour induire des lésions de l'ADN (rayonnement ultraviolet ou traitement chimique). L'expérience de photoblanchiment permet alors d'étudier la mobilité des protéines de la réparation en faisant l'hypothèse que si la protéine d'intérêt joue un rôle dans la réparation au moment du blanchiment, elle est donc moins mobile puisqu'elle reste fixée à la matrice nucléaire.

Les expériences de photoblanchiment ont notamment permis de statuer quant à l'assemblage séquentiel des protéines de la NER. Comme la constante de diffusion de chaque facteur est connue de façon théorique par rapport à la taille de la protéine, la quantification de la récupération de la fluorescence permet de comparer le coefficient de diffusion calculé, à la théorie. Si la protéine d'intérêt fait partie d'un complexe (comme dans le cas de la théorie du repairosome), sa mobilité est réduite par rapport à si elle évolue librement. Le temps de rétention au niveau d'une lésion a ainsi été déterminé pour chaque facteur (Feuerhahn *et al.*, 2008). Le complexe hHR23B/XPC est immobilisé pendant 1 à 2 min, le facteur TFIIH 4 min,

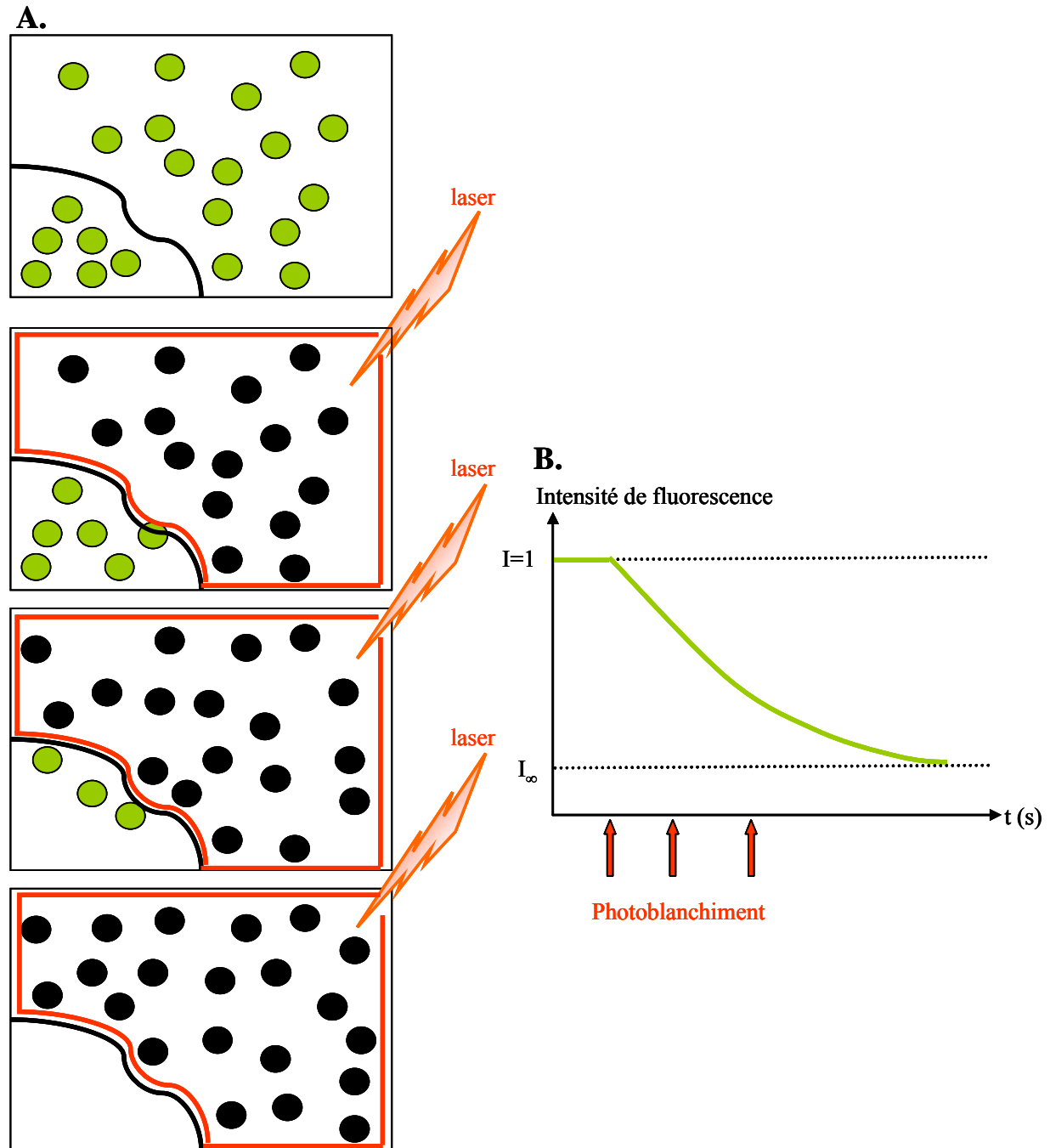


Figure 28: La perte de fluorescence induite par photoblanchiment (FLIP)

A/ Le principe de la méthode. Les cercles verts correspondent à une protéine de la réparation marquée de façon fluorescente avec la GFP. Le laser blanchit une zone précise de la cellule: les molécules perdent leur fluorescence (cercle noir). Du fait du mouvement des molécules fluorescentes, plusieurs flash lumineux sont nécessaires pour faire disparaître la fluorescence de la zone considérée. **B/** La courbe d'intensité de fluorescence en fonction du temps

XPA 4 à 6 min, XPG 3,5 min et XPF/ERCC1 4 min. Ainsi l'excision du dommage durerait au minimum 5 à 6 min puisque XPC et XPF ne peuvent co-localiser au niveau du brin endommagé (Hoogstraten *et al.*, 2008).

Ces deux techniques ont permis de montrer que le complexe XPC/hHR23B était beaucoup moins mobile que les autres facteurs de la NER et que ce complexe faisait la navette entre le noyau et le cytoplasme dans le cas où l'ADN n'est pas endommagé (Hoogstraten *et al.*, 2008). Les techniques d'imagerie FRAP et FLIP ont permis de comprendre l'organisation spatio-temporelle de la voie NER de façon très précise. En effet, il est possible de blanchir une région très précise du noyau et d'observer ensuite le mouvement de la protéine d'intérêt au niveau de la chromatine condensée et de la région péri-chromatique (Solimando *et al.*, 2009).

Les techniques de photoblanchiment ont été introduites au milieu des années 70, mais connaissent un réel essor seulement depuis les années 2000 du fait des avancées dans les technologies de l'imagerie et de la facilité d'exprimer une protéine fluorescente (fusion avec la GFP) (Koster *et al.*, 2005).

Une des limites de ces techniques est l'effet du marquage fluorescent de la protéine d'intérêt. En effet, il est tout à fait envisageable que la fusion avec la GFP puisse modifier la mobilité de la protéine d'intérêt (Koster *et al.*, 2005). De plus, le photoblanchiment lui-même peut être considéré comme un événement toxique pour la cellule du fait de la très haute énergie (de l'ordre du mW) du flash lumineux reçu par la cellule (Dobrucki *et al.*, 2007).

Si les techniques d'imagerie apportent des informations en terme de cinétique et de recrutement des facteurs de réparation, elles ne nous renseignent pas sur les activités enzymatiques. Ces techniques ne permettent pas de mesurer des activités de réparation, elles permettent uniquement de décrire un état de la cellule à un moment donné. Les tests *in vivo* et *in vitro* présentés par la suite apportent donc des informations complémentaires quant à la fonctionnalité des protéines de la réparation.

B. Tests *in vivo* : mesure d'activités de réparation au sein de la cellule

Contrairement aux techniques d'imagerie, qui nous apportent une information qualitative sur les mécanismes de réparation, les techniques présentées, ici, permettent de quantifier précisément des activités enzymatiques de réparation.

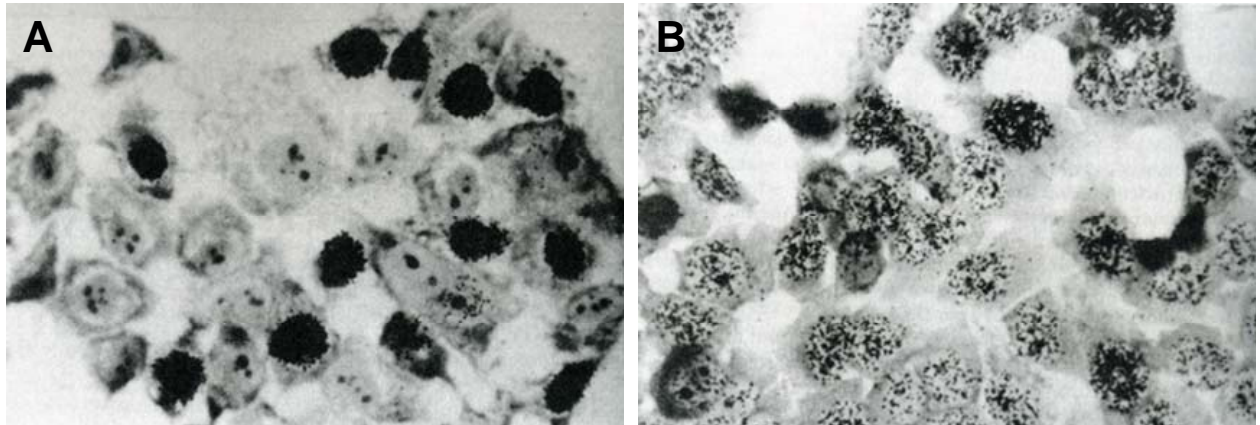


Figure 29: Les autoradiographies obtenues à la fin du test UDS réalisé sur des cellules HeLa
A/ Quelques cellules en phase S ont fortement incorporé la thymidine tritiée. En revanche, les cellules en G1 ne possèdent pas de foyer de réparation.
B/ Les cellules ont été irradiées (UV) au préalable. Les petits noirs correspondent à des foyers de réparation où de la thymidine tritiée a été incorporée lors de l'étape de resynthèse de la NER.

1. Le test UDS (Unscheduled DNA Synthesis)

Le test UDS (Unscheduled DNA Synthesis), ou encore la synthèse d'ADN non programmée mesure la resynthèse d'ADN qui a lieu lors de la NER et non lors de la phase S (« unscheduled »). Elle n'a jamais été utilisée pour mesurer l'étape de resynthèse de la BER bien que cela soit théoriquement possible. Le principe de cette méthode a été décrit pour la première fois, en 1964, par R.E Rasmussen et R.B Painter (Rasmussen *et al.*, 1964).

Ce test est réalisé à partir d'une culture cellulaire, généralement des fibroblastes cutanés. Il s'agit en premier lieu de traiter les cellules de telle façon qu'elles n'effectuent plus de synthèse d'ADN liée à la réplication. Il est capital d'avoir le moins de cellules possible répliquant leur ADN pour limiter le bruit de fond. Pour ce faire, les cellules sont cultivées à confluence dans un milieu dépourvu d'arginine, afin de limiter les divisions, puis elles sont traitées avec de l'hydroxyurée (Lehmann *et al.*, 1980). Grâce à ce composé, la concentration cellulaire en désoxynucléotides triphosphates (dNTP) se retrouve alors fortement réduite, empêchant la réplication d'avoir lieu. Cependant, il est important de noter que ce niveau faible en dNTP n'empêche pas la synthèse d'ADN lors de la réparation (Friedberg *et al.*, 2006). Pour empêcher la réplication de l'ADN, le milieu de culture peut également être carencé en SVF (1% au lieu de 15% habituellement).

Les cellules sont ensuite traitées afin de former des dommages de l'ADN. Le traitement le plus couramment utilisé pour étudier la NER est une exposition aux UVC (entre 0 et 15 J/m²). Après l'irradiation, les cellules sont mises en présence de thymidine tritiée pendant 3 h : le nucléotide radiomarké est incorporé durant l'étape de resynthèse de la NER. Les cellules sont ensuite lavées afin d'éliminer la thymidine tritiée non incorporée : les cellules sont mises en présence de thymidine non radiomarkée pendant 1 h. Enfin, les cellules sont fixées et une autoradiographie est réalisée. La quantification de la réparation est effectuée à l'aide d'un microscope. Pour chaque lame, les grains correspondant à l'incorporation de radioactivité sont comptés dans environ 30 noyaux. Ces grains correspondent aux foyers de resynthèse dus à la réparation par la voie NER (**Figure 29**).

Comme nous l'avons vu précédemment, cette technique est utilisée en France à l'Institut Gustave Roussy pour le diagnostic des personnes atteintes de Xeroderma pigmentosum. Un autre test découlant de cette méthode permet de mesurer la reprise de la synthèse d'ARN (test RRS pour RNA Recovery Synthesis). Son principe est globalement similaire à celui du test UDS, excepté qu'il s'agit dans ce cas de mesurer l'incorporation d'uridine marquée

radioactivement dans l'ARN. Cette méthode, quant à elle, est utilisée pour le diagnostic des personnes atteintes du syndrome de Cockayne.

Le principal avantage de la synthèse d'ADN non programmée est qu'elle permet de mesurer la réparation *in cellulo*. Cette technique a malheureusement beaucoup d'inconvénients. Le premier est l'utilisation de la radioactivité comme moyen de détection, qui rend lourde la mise en place des expériences. Cependant, une récente étude laisse présager une nette amélioration du test UDS (Limsirichaikul *et al.*, 2009) puisque la synthèse non programmée est ici mesurée grâce à l'incorporation du 5 ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) qui est un analogue de la thymidine. En conjuguant l'EdU avec un azide fluorescent, il devient alors facile de visualiser la réparation. D'autre part, le test UDS requiert beaucoup de temps, il faut compter environ 15 jours entre la mise en culture des fibroblastes et la quantification des grains radioactifs dans les noyaux.

Les écarts-types obtenus avec cette technique sont très importants. Pour caractériser un fibroblaste de patient XP, la diminution de la réparation par rapport au témoin doit être au moins de 50% (Lehmann *et al.*, 1980). De plus, le test est sensible à l'état physiologique des cellules. Ainsi, la confluence des cellules au moment du test est un paramètre pouvant apporter une grande variabilité dans les résultats obtenus (Lehmann *et al.*, 1980). Enfin, le traitement appliqué aux cellules pour les synchroniser et les bloquer en G1 peut être considéré comme un stress important pouvant ainsi biaiser la réponse cellulaire observée.

Ce test n'est pas un bon indicateur quantitatif puisque le test est dépendant de la quantité cellulaire en thymidine (Friedberg *et al.*, 2006). En effet, les drogues utilisées pour synchroniser les cellules agissent le plus souvent sur la synthèse des dNTPs. Ainsi, ce test n'est pas adapté pour comparer différents types cellulaires, chaque type ayant un métabolisme et une quantité de dNTPs différents. En théorie, la réparation mesurée par UDS ne reflèterait pas le nombre de sites de réparation mais la taille du fragment d'ADN resynthétisé (Zelle *et al.*, 1979). En effet, si un fragment plus grand est excisé mais la réparation prend en charge un nombre réduit de sites, la quantification globale de la réparation ne sera pas diminuée. Enfin, le protocole expérimental de l'UDS suggère que le test mesure en majeure partie la réparation des 6-4 PPs plutôt que la réparation des CPDs puisque les cellules réparent pendant 4 h après l'irradiation puis elles sont fixées (Galloway *et al.*, 1994).

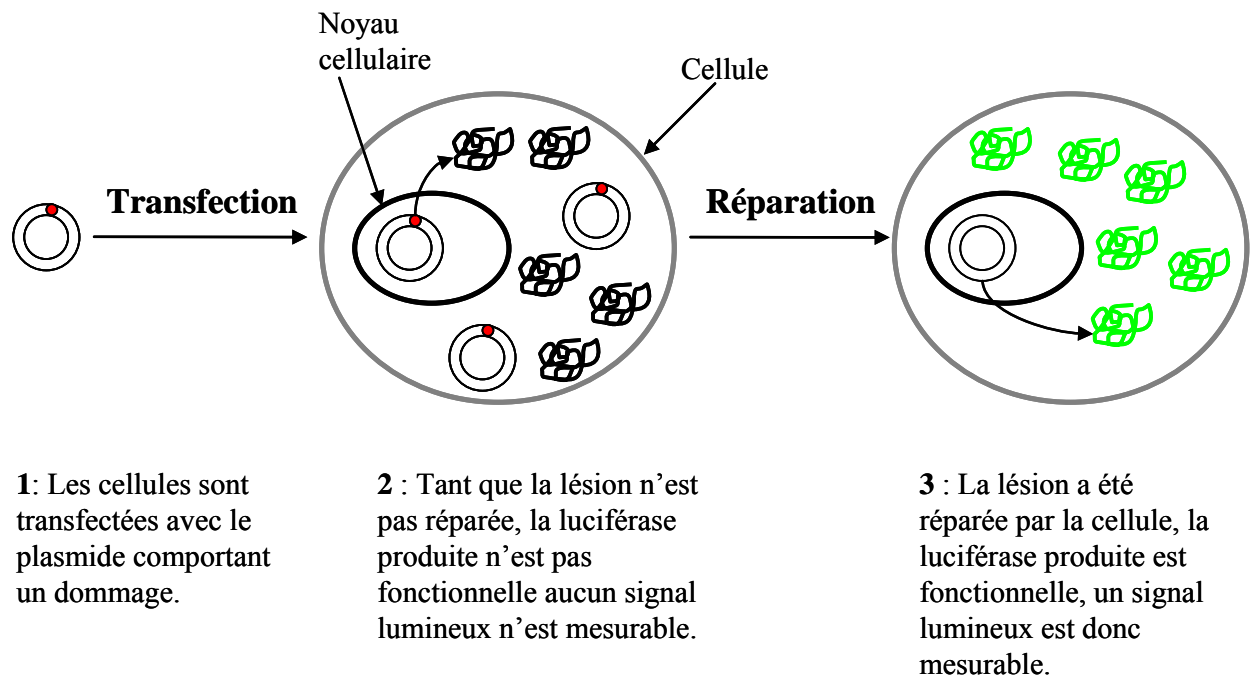


Figure 30: Le principe du test HCR

2. Le test HCR (Host Cell Reactivation)

Le test HCR (Host Cell Reactivation) est basé sur la transfection de cellules dites « hôtes » avec un plasmide non répliquatif et de petite taille (5 kb) et sur la mesure d'une activité enzymatique. Cette activité est quantifiable, si et seulement si, le plasmide lésé a été réparé.

Le plasmide contient un gène rapporteur codant, par exemple pour la luciférase (Merkle *et al.*, 2004), la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) (Athas *et al.*, 1991; Levy *et al.*, 1995), la β galactosidase (β Gal) (Francis *et al.*, 1999) ou la GFP (Green Fluorescent Protein) (Sattler *et al.*, 2003) (**Figure 30**). Ce plasmide est traité *in vitro* par des agents génotoxiques physiques (radiations UV) ou chimiques (stress oxydant) de façon à créer des dommages connus de l'ADN. Un oligonucléotide synthétique contenant un type de lésion précis peut également être cloné dans un vecteur plasmidique. L'expression du gène rapporteur est inactivée par la présence de la lésion et ce de deux manières possibles : soit la présence de la lésion bloque la transcription du gène (ex : dimères de pyrimidine) (Qiao *et al.*, 2002), soit elle induit une mutation dans un codon modifiant ainsi un acide aminé essentiel au bon fonctionnement de la protéine (ex : diols de thymine) (Spivak *et al.*, 2006). Le plasmide lésé est transfecté par des méthodes chimiques permettant de perméabiliser la membrane des cellules cibles préalablement mises en culture. L'activité de réparation cellulaire est mesurée en quantifiant l'activité du gène rapporteur après la lyse des cellules. Si la cellule n'a pas réussi à réparer la lésion alors l'expression du gène rapporteur est nulle; au contraire, si la lésion a été éliminée et la resynthèse de l'ADN est fidèle, l'expression du gène rapporteur est efficace (Figure 30). Ainsi, dans les cellules déficientes pour XPA, l'activité CAT est 100 fois inférieure à celle observée dans une souche normale après une irradiation UVC du plasmide (1 kJ/m²) (Levy *et al.*, 1995). Des expériences de HCR, utilisant la souche XP12RO, montrent un niveau d'expression de la luciférase 50 % plus faible par rapport à une souche témoin (Camenisch *et al.*, 2007). Ce niveau est relativement élevé en comparaison avec les taux très faibles obtenus par le test UDS (2 %). Par ailleurs, une autre étude montre des niveaux de HCR comparables aux niveaux obtenus avec le test UDS (Athas *et al.*, 1991). Ces deux exemples, aux résultats différents soulignent la variabilité des données de la littérature concernant les souches XP. De plus, ils suggèrent qu'il est difficile de comparer des niveaux de réparation issus de deux méthodes expérimentales différentes. A l'intérieur d'un même groupe de complémentation XP, les valeurs HCR sont également assez variables reflétant ainsi l'hétérogénéité au sein d'un même groupe (Francis *et al.*, 1999). Par exemple, pour trois

souches XPC différentes, les valeurs HCR oscillent entre 25 et 75 % du niveau obtenu avec des cellules normales.

Le test HCR a été adapté afin de co-transfecter deux vecteurs dans la cellule hôte : un vecteur porte le gène rapporteur, le deuxième vecteur contient la séquence d'un gène XP (Carreau *et al.*, 1995). Cette méthode permet entre autre de connaître le groupe de complémentation auquel appartient l'enfant diagnostiqué XP.

La méthode HCR offre plusieurs avantages. Tout d'abord, ce test permet la mesure des activités de réparation de pratiquement tous les systèmes de réparation et ce *in cellulo*. En effet, ce test *in vivo* permet théoriquement de mesurer la BER, la NER, la réparation des mésappariements, la réversion directe, à partir du moment où la lésion introduite est capable d'inhiber l'expression ou l'activité de la protéine rapportrice. Une variante de ce test a même été développée afin de mesurer la réparation des cassures double brins par les systèmes de réparation par recombinaison (Slebos *et al.*, 2001).

Lorsque que la lésion a été introduite par clonage d'un oligonucléotide synthétique dans le vecteur, l'avantage est la maîtrise parfaite de la nature et de la quantité du dommage dont on va étudier la réparation. En effet, l'introduction de la lésion dans la séquence d'ADN du gène rapporteur est réalisée par synthèse chimique, seul le type de dommage désiré sera donc présent. De plus la synthèse chimique offre l'autre avantage de choisir précisément le nombre de dommages introduits, ainsi que de réaliser des sites multi-lésés, mais aussi d'introduire la lésion dans le brin transcrit ou non transcrit afin d'étudier la réparation couplée à la transcription. Contrairement au test UDS, cette technique permet l'évaluation des capacités de réparation de l'ADN chez des cellules qui n'ont pas été soumises à un stress génotoxique préalable.

Le principal inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite la transfection de cellules. Or toutes les cellules ne sont pas facilement transfectables. De plus, la transfection n'est pas un événement neutre pour la cellule, elle peut modifier sa physiologie et donc biaiser la réponse observée.

C. Tests *in vitro* : mesure d'activité de réparation en dehors de la cellule

Nous allons nous intéresser pour finir aux tests *in vitro* de mesure d'activités de réparation de l'ADN. Comme leur nom l'indique, ces tests se font en dehors des cellules. Ces tests peuvent être réalisés soit à partir d'un lysat cellulaire au contenu peu défini, soit à partir d'un jeu de protéines purifiées.

1. Du lysat cellulaire au système reconstitué de protéines purifiées

Historiquement, les tests *in vitro* ont utilisé en premier lieu des lysats cellulaires, puis des fractionnements de ces lysats cellulaires sur colonne de chromatographie composée de phosphocellulose (Aboussekhra *et al.*, 1995; Mu *et al.*, 1995) ont permis de sub-diviser le mélange de protéines pour former des groupes assez bien définis. Enfin, les progrès en matière de purification protéique ont permis d'aller vers des systèmes reconstitués de protéines, entièrement purifiées et caractérisées. Dans tous les cas, les tests *in vitro* consistent à incuber de l'ADN endommagé avec un lysat cellulaire, un lysat fractionné ou un mélange déterminé de protéines.

Les lysats cellulaires sont préparés par lyse des cellules en jouant le plus souvent sur la différence de pression osmotique régnant à l'intérieur des cellules et le tampon dans lequel elles sont resuspendues (Dignam *et al.*, 1983). Suivant le protocole utilisé, le lysat cellulaire peut être plus ou moins spécifique d'un compartiment de la cellule. En effet, il est possible de réaliser des lysats dits « totaux » où toutes les protéines de la cellule sont récupérées, mais aussi des lysats nucléaires, mitochondriaux, cytoplasmiques, etc.

2. Utilisation de lysats cellulaires

Le premier test *in vitro* permettant de mesurer quantitativement des activités de la NER à partir de lysats cellulaires a été décrit par R. Wood en 1988 (Wood *et al.*, 1988). Cette méthode tire profit, tout comme la méthode UDS, de l'étape de resynthèse d'ADN lors de la NER pour incorporer, dans un plasmide comportant une lésion, un nucléotide marqué radioactivement. Les plasmides sont ensuite précipités et linéarisés par l'action d'enzymes de restriction, puis une électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les différents fragments d'ADN générés par l'action des enzymes du lysat cellulaire. Enfin, une autoradiographie permet de quantifier la radioactivité incorporée lors de la réparation des plasmides. Afin de visualiser la resynthèse spécifiquement due à la réparation, la même réaction est réalisée avec un plasmide non endommagé. La radioactivité incorporée dans le plasmide exempt de dommage permet d'évaluer la part de la réparation dite « gratuite » dans la réaction de réparation *in vitro*. Il est important de tenir compte de cette réparation non spécifique pour pouvoir comparer des activités de réparation de plusieurs lysats. Par exemple, il a déjà été montré qu'un lysat préparé à partir de cellules XPA entraîne plus de coupures

Réactif	Concentration lors de l'excision-resynthèse
Hepes KOH pH 7.8	45 mM
MgCl ₂	7.4 mM
DTT	0.9 mM
dGTP	20 µM
dATP	8 µM
dTTP	20 µM
dCTP	20 µM
glycerol	3.4 %
phosphocréatine	40 mM
EDTA	0.4 mM
créatine phosphoKinase	50 µg/mL
BSA	0.36 mg/mL
KCl	70 mM
ATP	2 mM
dATP radiomarké	74 kBq
Extrait cellulaire (total)	de 1,6 à 3 mg/mL
Temps de la réaction	3h
Température de la réaction	30°C

Tableau 6 : Les conditions expérimentales lors du test d'excision-resynthèse *in vitro* de référence. Adapté de Wood *et al.*, 1988

aspécifiques qu'un lysat préparé à partir de cellules saines (Hansson *et al.*, 1989). De plus, dans les lysats obtenus à partir de cellules XP, le niveau d'incision du plasmide endommagé est fortement réduit par rapport à celui d'un lysat de cellules saines (Masutani *et al.*, 1993). Néanmoins, le niveau n'est pas nul.

Les conditions ioniques lors de la réaction d'excision-resynthèse à partir de lysats cellulaires sont très importantes. Ainsi, la réaction nécessite des ions Mg^{2+} (Sugasawa *et al.*, 1993; Calsou *et al.*, 1996a). En effet, les ions Mg^{2+} sont indispensables pour l'activité des polymérases ; les réactions consommant de l'ATP ont besoin de Mg^{2+} . De plus, la concentration en KCl est également très importante pour le bon fonctionnement de la réaction. La concentration en KCl a été testée plusieurs fois dans la littérature et les résultats sont assez semblables : entre 25 mM et 70 mM, il n'y a pas d'effet notoire sur la réparation alors qu'à 100 mM, 50% d'inhibition de la réparation a été observée et celle-ci devient totale à 150 mM (Sugasawa *et al.*, 1993; Calsou *et al.*, 1994). La concentration saline influe sur la processivité des facteurs de la NER. Le caractère processif de l'activité endonucléasique est maximal lorsque la concentration en sel est nulle (Gruskin *et al.*, 1986). Quand la concentration augmente, la processivité diminue pour aller vers un mécanisme distributif. Pour résumer, la réaction d'excision se fait généralement en ajoutant de l'ATP (Calsou *et al.*, 1994) ainsi que des ions Mg^{2+} et en ajustant la concentration en KCl (**Tableau 6**).

La lésion portée par le plasmide peut être introduite de différentes manières, soit en incorporant dans le plasmide un oligonucléotide de synthèse comportant une ou plusieurs lésions, soit en traitant les plasmides chimiquement ou avec un rayonnement. Dans le second cas, la position et le nombre de lésions par plasmide sont plus délicats à contrôler.

Enfin, G.L. Dianov a montré que cette méthode est aussi utilisable pour mesurer la réparation par excision de base, en tirant partie, là aussi de l'étape de resynthèse d'ADN (Dianov 2003). En effet, la réparation des lésions oxydatives comme la 8-oxoG a été étudiée à partir de lysats cellulaires. Alors que la réparation de cette lésion semble diminuée dans des lysats XPA et XPB, elle est augmentée dans un lysat XPD et CSA (Jaiswal *et al.*, 1998). Ceci renforce l'idée de l'existence d'interactions entre les systèmes BER et NER.

Ce test *in vitro* à partir de lysat cellulaire, présente l'avantage d'être particulièrement sensible, mais l'utilisation de la radioactivité peut être aussi considérée comme un inconvénient. La structure de l'ADN utilisé lors de telles expériences semble également jouer

un rôle non négligeable. Ainsi, lorsque l'ADN endommagé est « nu », les lysats XPA et témoin présentent les mêmes niveaux d'excision des dimères de thymine (Mortelmans *et al.*, 1976). Cependant, lorsque que l'ADN est sous une forme plus proche de ce qui est trouvé *in vivo* (ie. organisation en nucléosome), la réparation des lysats XPA est cette fois-ci diminuée par rapport au lysat contrôle.

Des tests *in vitro*, permettant de mesurer uniquement l'excision, ont également été développés ; ces tests s'intéressent principalement aux activités glycosylases de la BER. Le principe est tout d'abord de marquer radioactivement à une de ses extrémités, un oligonucléotide double brin portant une lésion. L'oligonucléotide est ensuite incubé avec des lysats cellulaires ou des enzymes de réparation purifiées. Si au cours de cette étape une excision a lieu, alors l'oligonucléotide portant la lésion est coupé en deux. Une électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant suivie d'une autoradiographie du gel permettent de conclure quant à l'incision du dommage. Si une incision a eu lieu, deux bandes distinctes seront observées, une correspondant à l'oligonucléotide portant la lésion non excisée, et l'autre correspondant au fragment d'oligonucléotide formé lors de l'excision. Il est alors possible de calculer des rendements réactionnels en quantifiant la radioactivité présente dans chaque bande (Guerniou *et al.*, 2005). En connaissant la quantité d'oligonucléotide excisé et non excisé, le calcul de constantes enzymatiques est également envisageable.

De façon générale, les tests *in vitro* à partir de lysats cellulaires présentent l'avantage de pouvoir étudier la réparation dans des tissus très différents : tissus humains (fibroblastes, lymphoblastes, lignées HeLa etc.) (Mortelmans *et al.*, 1976; Hansson *et al.*, 1989; Sibghatullah *et al.*, 1989; Calsou *et al.*, 1994; Barret *et al.*, 1996), tissus murins (Coudore *et al.*, 1997), mais aussi de tester différents compartiments cellulaires en récupérant les protéines à différents moments de l'extraction (lysats totaux, cytoplasmiques, nucléaires, mitochondriaux) et enfin de tester un grand nombre de types de lésions. De plus, il est assez facile d'étudier l'effet d'addition de molécules, par exemple inhibitrices, aux lysats cellulaires et de tester ensuite leur activité de réparation.

3. Systèmes reconstitués avec des protéines purifiées

Pour finir sur les méthodes permettant d'étudier la réparation, nous allons voir comment un système de réparation peut être reconstitué *in vitro* à partir de protéines purifiées. Dans ce cas, les protéines sont connues, la réaction est totalement maîtrisée. Ce type de méthode permet une mesure qualitative de la réparation, et non quantitative comme avec un lysat cellulaire.

Les systèmes reconstitués réunissent généralement un plasmide, contenant un type de lésion et un mélange de protéines purifiées. Lorsque les facteurs hHR23B/XPC, TFIIH, RPA, XPA, XPG, ERCC1/XPF sont présents dans le mélange, la double incision du brin endommagé a lieu (Aboussekhra *et al.*, 1995; Araujo *et al.*, 2000; Tapias *et al.*, 2004). Dès qu'un des facteurs est absent, la réaction n'a plus lieu. Grâce à ces expériences utilisant un système reconstitué de protéines purifiées, les 6 facteurs essentiels à la voie NER ont donc pu être identifiés. Ces expériences avec des protéines purifiées ont permis de mettre en évidence le rôle annexe de DDB2 dans la NER puisque la voie de réparation peut être reconstituée sans cette protéine (Aboussekhra *et al.*, 1995). Les systèmes reconstitués ont été testés sur plusieurs types de dommages : des plasmides irradiés (Aboussekhra *et al.*, 1995), des plasmides traités par du psoralène créant des pontages inter-brins (Bessho *et al.*, 1997) ou des plasmides traité par du cisplatine créant des pontages intra-brins (Araujo *et al.*, 2000; Tapias *et al.*, 2004).

Le principal avantage de cette méthode est la facilité de la mise en œuvre des expériences. La réaction peut être très bien contrôlée puisque tous les composants sont connus et purifiés. Cependant, l'utilisation d'un système purifié est quelque peu simpliste par rapport à ce qui se passe réellement dans la cellule. Comme nous l'avons vu précédemment, les réactions mises en jeu lors de la NER font intervenir une multitude de facteurs dans un contexte particulier qui est l'organisation chromatinienne de l'ADN. La reconstitution du système NER avec des protéines purifiées a été réalisée par Araki *et al.* en utilisant comme support un mini-chromosome à la place d'un plasmide bactérien. La double incision a également lieu en présence des six facteurs décrits précédemment mais il semblerait que la structure chromatinienne influencerait sur le déroulement de la réaction (Araki *et al.*, 2000). De nombreuses interactions ont également lieu entre les différents facteurs ; celles-ci n'ont vraisemblablement pas lieu lors d'expériences d'excision avec un système purifié. En étudiant la réparation d'un brin transcrit, Laine et Egly obtiennent seulement 1% d'excision du dommage (Laine *et al.*, 2006b). Cette très faible activité obtenue peut être expliquée en partie par l'absence de facteurs essentiels dans le mélange de protéines purifiées.

Objectifs

Le diagnostic du Xeroderma pigmentosum, maladie génétique de la réparation de l'ADN, fait appel classiquement à la méthode UDS, décrite dans le chapitre I. Cette méthode mesure l'incorporation de nucléotides radiomarqués dans l'ADN de fibroblastes exposés aux UV. Les fibroblastes sont d'abord mis en culture à partir d'une biopsie de peau, réalisée chez le patient. Cette première étape nécessite plusieurs semaines avant d'avoir suffisamment de cellules pour réaliser le test. Le test UDS, lui-même, requiert plus d'une semaine avant d'avoir le résultat. Ainsi, le diagnostic de cette maladie est long et les résultats sont quelques fois difficilement interprétables. En effet, il arrive que la mesure UDS donne un niveau de réparation intermédiaire c'est-à-dire inférieur à ce qui est mesuré dans des cellules normales mais supérieur à ce qui est observé dans des cellules XP, utilisées comme référence. Il est alors difficile de conclure quant au diagnostic de la maladie.

La réparation de l'ADN regroupe un ensemble de mécanismes faisant intervenir un grand nombre de protéines et où de nombreuses interactions entre les différentes voies de réparation ont été mises en évidence. Ainsi, de nombreuses implications de protéines de la NER dans la réparation des lésions prises en charge par la BER (CF Chapitre I) ont notamment été décrites. Cependant, malgré cette complexité, la réparation est, généralement appréhendée dans les tests *in vitro* et *in vivo* de manière assez simpliste. En effet, la réparation d'un seul type de lésion est la plupart du temps analysée. Par exemple, le test UDS mesure globalement la réparation des lésions (photoproduits et dommages oxydatifs) générées par l'irradiation ultraviolette.

Nous sommes donc partis de deux constats. D'un côté, le diagnostic de la maladie XP est long et dans certains cas, peu concluant, et d'un autre côté il n'existe pas de test, permettant d'appréhender la complexité de la réparation à savoir les spécificités des différentes voies, leurs relations ou interactions, les co-régulations pouvant exister entre les différentes voies. Le but initial du projet, bâti à partir des données de la littérature, consistait donc à mettre au point les conditions expérimentales pour développer un outil rapide et fiable pour le diagnostic de la maladie XP.

Pour cela, nous utilisons les tests *in vitro* développés au laboratoire. Ces tests permettent la quantification précise des activités d'excision des ADN *N*-glycosylases (puce oligo) ou d'excision-resynthèse (puce plasmide) à partir de lysats cellulaires. Le principal avantage de nos tests, par rapport à l'UDS et au test *in vitro* de référence décrit dans la littérature (Wood *et al.*, 1988), est la mesure simultanée d'activités de réparation de plusieurs lésions à partir du même lysat cellulaire. Ainsi, le test d'excision-resynthèse permet d'analyser les activités de

Objectifs

réparation pour des lésions prises en charge par deux voies de réparation différentes : la BER (Base Excision Repair) et la NER (Nucleotide Excision Repair) et nous permet donc d'avoir une vision à la fois globale et spécifique de la réparation.

Nous avons mesuré de façon conjointe des activités de réparation de plusieurs lésions, fixées sur un support, afin d'obtenir une cartographie de la réparation de l'ADN propre à chaque groupe de complémentation XP. L'objectif était d'arriver à proposer des phénotypes de réparation de l'ADN à partir de peu de cellules afin de pouvoir rendre une réponse au patient plus rapidement qu'avec la méthode UDS.

Notre défi consistait donc à être capable de quantifier des activités de réparation à partir d'un nombre réduit de cellules (quelques millions) et donc de quantités de protéines relativement limitées par rapport à ce qui est décrit dans la littérature. C'est pourquoi nous avons débuté l'étude avec des concentrations protéiques réalistes, c'est-à-dire obtenues facilement à partir d'un nombre gérable de boîtes de culture. Nous avons choisi de débiter le projet en utilisant des cellules HeLa siRNA modélisant la maladie XP. Les premiers résultats obtenus à partir de ce modèle cellulaire nous ont amenés à revoir notre stratégie.

Nous nous sommes, en effet, rendus compte de la difficulté à caractériser des phénotypes de réparation de l'ADN pour les différents XP. Contrairement à ce qui était décrit dans la littérature, nous n'obtenions pas des signatures en termes d'activités de réparation bien distinctes entre un lysat témoin et un lysat XP.

Ainsi, nous avons cherché à identifier ce qui pouvait être à l'origine des ces résultats surprenants. Il s'agissait avant tout de comprendre quels étaient les mécanismes réactionnels mis en jeu lors de nos tests sur support.

Nous avons ainsi testé l'effet de plusieurs paramètres pour tenter d'expliquer les résultats des caractérisations phénotypiques de la réparation dans le but d'aboutir à des phénotypes spécifiques de chaque groupe XP. Nous avons, donc, analysé l'effet de la concentration protéique lors de l'excision-resynthèse ainsi que la réponse cellulaire à des traitements génotoxiques de différente nature, en termes d'activités de réparation et ce pour les différentes lignées cellulaires (XP et témoin).

Les résultats présentés dans ce manuscrit s'articulent en trois parties. La première partie introductive, permet de définir certains termes employés et de clarifier le principe de nos tests par rapport au test *in vitro* de référence, décrit dans la littérature (Wood *et al.*,

1988). La deuxième partie traite de l'étude préliminaire réalisée à partir du modèle siRNA. Enfin, la troisième partie, plus conséquente, montre l'ensemble des résultats obtenus avec des lignées de fibroblastes. Nous analyserons alors, comment les variations de certains paramètres ont des conséquences marquées sur les activités de réparation mesurées avec la puce plasmide (concentration protéique, temps de la réaction, lysat total *vs* nucléaire, réponse à un traitement génotoxique). Cette étude nous renseignera quant aux rôles de XPA et XPC sur la régulation dynamique des activités d'excision/resynthèse.

Objectifs

Chapitre II

Résultats

Chapitre II

Partie I

Introduction

L'objectif de l'étude est de mesurer des activités d'excision et de resynthèse à partir de lysats cellulaires. Dans la littérature, la méthode de référence, qui se rapproche le plus du test *in vitro* que nous utilisons, consiste à mesurer l'excision-resynthèse en solution en incubant le lysat cellulaire avec de l'ADN plasmidique comportant des lésions (Wood *et al.*, 1988). Ce test de référence mesure l'incorporation d'un nucléotide radioactif dans l'ADN réparé. La révélation du test se fait donc par autoradiographie. Le test *in vitro* que nous utilisons, ici, pour étudier la réparation de l'ADN s'inspire de la méthode de référence décrite dans la littérature mais présente aussi des particularités.

I. Comparaison de notre test avec le test de référence

La méthode de référence permet l'étude la réparation de l'ADN en solution, en incubant dans un même tube, le lysat cellulaire avec à la fois un plasmide non lésé, pour mesurer la part de la réparation non-spécifique, et avec un plasmide comportant une lésion de l'ADN (adduit cisplatine, 8-oxoG ou photoproduits) (Hansson *et al.*, 1989; Robins *et al.*, 1991). Le test de référence est très souvent conduit (dans plus de la moitié des études) sur un plasmide irradié par des UV pour étudier la réparation des photoproduits (Wood *et al.*, 1988; Hansson *et al.*, 1989; Sibghatullah *et al.*, 1989; Hansson *et al.*, 1990; Robins *et al.*, 1991; Masutani *et al.*, 1993; Sugasawa *et al.*, 1993; Szymkowski *et al.*, 1993; Calsou *et al.*, 1994; Aboussekhra *et al.*, 1995; Barret *et al.*, 1996; Calsou *et al.*, 1996b; Coudore *et al.*, 1997; Jaiswal *et al.*, 1998; Araki *et al.*, 2000). La réparation de l'ADN est rarement mesurée sur plus d'un type de lésion à la fois. La seule étude abordant simultanément la réparation de plus d'une lésion à la fois, a été réalisée avec un mélange d'oligonucléotides (et non pas de plasmides) comportant soit une uracile soit un diol de thymine, deux lésions spécifiques de la BER (Dianov 2003). Le lysat cellulaire peut également être incubé en présence de deux types de lésions (par exemple le plasmide pUC19 traité par le NA-AAF et le plasmide pUC19 irradié par des UV) mais l'incorporation du nucléotide radiomarqué n'est mesurée que pour un seul type de lésion (par exemple le plasmide pUC19 traité par le NA-AAF) (Hess *et al.*, 1996). Cette stratégie permet d'étudier les phénomènes de compétition pouvant avoir un impact sur la réparation globale de la lésion considérée mais en aucun cas, il s'agit de mesurer la réparation de deux types de lésions de façon simultanée.

Dans notre cas, l'excision-resynthèse est envisagée en quantifiant simultanément lors d'une seule et même réaction biochimique, les activités de réparation de plusieurs lésions (*ie.* 6), en présence également d'un plasmide contrôle. Ainsi, nous mesurons l'ER (Excision-Resynthèse) qui a lieu au niveau d'un mélange de photoproduits (CPDs et 6-4 PPs) (pCDP-

64), d'adduits cisplatine (pCisP), de bases oxydées comme la 8-oxoG (p8oxoG) et les diols de pyrimidine (pGlycol), au niveau des bases alkylées (pAlkB) et des sites abasiques (pAbaS). Les résultats obtenus avec ce test multiplexé seront donc confrontés aux données existantes obtenues avec le test de référence. Il s'agira aussi d'analyser si le fait d'étudier la réparation de plusieurs lésions simultanément apporte de nouvelles informations. En effet, nous étudions, ici, la réparation de lésions prises en charge en théorie par deux voies différentes, la BER et la NER. Qu'en est-il de la réparation de l'ensemble de ces lésions sur la puce plasmide? Des expériences réalisées en cinétique nous permettront de comparer les vitesses de réaction obtenues pour chaque type de lésions.

Le test de référence décrit dans la littérature utilise, la plupart du temps, des lysats totaux c'est-à-dire des lysats contenant l'ensemble des protéines de la cellule sans distinction de compartiment. Nous avons fait le choix de travailler majoritairement à partir de lysats nucléaires. En effet, les études préliminaires réalisées par J.F Millau ont montré que l'utilisation de lysats totaux entraînait une réponse aspécifique. Il observe bien une augmentation de l'intensité de fluorescence totale en fonction du temps, mais au delà d'une phase plateau, le signal décroît. La présence dans ces lysats, d'activités enzymatiques capables de digérer l'ADN a ainsi été évoquée. Nous n'avons pas détecté de telles activités dans les lysats nucléaires. En effet, les cinétiques obtenues avec un lysat nucléaire décrivent des courbes atteignant un plateau stable. Ainsi, cette réponse aspécifique observée avec un lysat total n'est pas obtenue avec les lysats nucléaires.

Le lieu de la réparation de l'ADN étant le noyau, nous avons jugé plus pertinent d'étudier les enzymes de ce compartiment. Enfin, pour étudier l'impact d'un éventuel trafic des protéines de la réparation en réponse à un stress génotoxique, il était plus judicieux de travailler avec des lysats nucléaires. En effet, il a été montré dans la littérature qu'après un traitement UV, la protéine XPA migre vers le noyau, lieu de la réparation (Wu *et al.*, 2007). On peut donc s'attendre à ce que la mesure des activités nucléaires permette de mettre en évidence les conséquences, au niveau fonctionnel, de ce transfert de protéines.

Pour notre projet, les phénotypes de réparation de l'ADN ont donc été établis pour des lysats nucléaires de cellules XP en utilisant un test *in vitro* permettant la mesure conjointe d'activités d'excision-resynthèse de plusieurs lésions différentes.

II. Les contraintes du test sur la puce plasmide

Nous avons vu dans le chapitre I, que le système de réparation par excision de nucléotides se divise en deux voies suivant si le gène dans lequel se trouve la lésion est en

cours de transcription ou non. Il existe donc une réparation liée à la transcription (TC-NER) et une réparation plus globale c'est-à-dire qui concerne l'ensemble des gènes qu'ils soient transcrits ou non (GG-NER). Grâce à notre test sur la puce plasmide, les activités NER mesurées correspondent à la voie globale (GG-NER) puisque l'ADN plasmidique du support n'est pas transcrit pendant la réaction d'ER.

Le test que nous utilisons pour mesurer des activités de réparation impose certaines conditions expérimentales de par l'utilisation de lysats cellulaires et de la mesure simultanée de la réparation de plusieurs lésions. Les différents paramètres expérimentaux ont été établis lors des travaux de J.F Millau. Les différents paramètres expérimentaux (concentration saline, ions et énergie nécessaire à la réaction, quantité de protéines) décrits dans la suite de ce paragraphe sont à comparer avec ceux de la méthode de référence (Chapitre I tableau 6).

La préparation des lysats nucléaires nécessite une forte concentration saline pour permettre la libération des protéines de ce compartiment. Ainsi, à la fin de la lyse, les protéines du noyau sont en solution dans un tampon contenant notamment 400 mM de KCl. L'équipe de B. Salles a étudié l'effet de la concentration en KCl lors de réactions de réparation *in vitro* (Calsou *et al.*, 1994; Coudore *et al.*, 1997). Ainsi, l'excision-resynthèse ne peut être mesurée en dessous de 50 mM de KCl à cause d'une trop grande dégradation de l'ADN par les nucléases présentes dans le lysat. La réaction est optimale lorsque la concentration saline est comprise entre 50 et 80 mM. Ces observations ont été confirmées par J.F Millau ; une concentration en KCl de 80 mM lors de la réaction sur la puce plasmide permet l'obtention du meilleur signal. Ainsi, la concentration en sels du lysat nucléaire doit être diminuée d'un facteur 5 (de 400 à 80 mM) pour pouvoir conduire la réaction dans les conditions salines optimales. Le lysat est donc dilué au 1/5^e dans le mélange réactionnel.

La concentration en $MgCl_2$ a, elle aussi, été déterminée afin que la réaction sur notre puce soit optimale. Ainsi, lors de la réaction, la concentration en $MgCl_2$ est de 7,3 mM. Les ions Mg^{2+} sont indispensables à la réaction d'ER car ils permettent aux réactions consommant de l'ATP d'avoir lieu. Dans la méthode de référence, la concentration en $MgCl_2$ est fixée à 7,5 mM (Paz-Elizur *et al.*, 2007).

La concentration en ATP, elle aussi, est importante lors de la réaction d'excision-resynthèse. J.F Millau a déterminé la gamme de concentration en ATP pour laquelle la réaction est optimale. Ainsi, une concentration comprise entre 1 et 2 mM d'ATP permet d'obtenir un signal maximum lors de la réaction d'excision-resynthèse du lysat. Nous avons choisi d'utiliser 2 mM ce qui est en accord avec le test de référence (Calsou *et al.*, 1994).

Enfin, la gamme de concentration de lysat cellulaire a également été étudiée par J.F Millau à partir d'extraits de cellules HeLa. Ainsi, il a testé une gamme de concentration entre 0,5 et 2 mg/mL pour un lysat nucléaire commercial de cellules HeLa. Comme nous le verrons par la suite, nous avons travaillé dans une gamme de concentrations comprises entre 0,3 et 1 mg/mL. Par rapport au test de référence, nous nous sommes placés dans une gamme de concentration plus faible. En effet, par rapport aux travaux de Calsou *et al.*, la réaction est conduite avec 10 fois moins de protéines (Calsou *et al.*, 1996b).

Dans le cas du test de référence, la quantification des activités de réparation se fait par autoradiographie. Le temps d'exposition est choisi de telle façon à mesurer à la fois la radioactivité incorporée dans le plasmide contrôle et dans le plasmide comportant une lésion. Cependant, il existe des études où la part de la radioactivité incorporée dans le plasmide contrôle n'apparaît pas (Robins *et al.*, 1991; Szymkowski *et al.*, 1993). Pourtant, il est impératif de connaître la part de la réparation dite gratuite lors de la réaction effectuée pour analyser la part de la réparation non spécifique qui a lieu lors de la réaction.

Dans le cas de notre test, la lecture de l'intensité de fluorescence nécessite le réglage du gain c'est-à-dire la puissance du photomultiplicateur du scanner. La lecture du signal fluorescent s'effectue au même gain pour toutes les réactions biochimiques mises en œuvre lors d'une expérience (*ie.* le même gain pour tous les lysats). Cela est indispensable pour pouvoir comparer les activités d'ER des différents lysats. Le gain est réglé de telle façon à obtenir une sensibilité maximale où l'incorporation de la fluorescence pourra être quantifiée au niveau de chaque plasmide présent sur le support. Ainsi, nous observons également un signal de fluorescence au niveau du plasmide contrôle.

Les conditions de formation des lésions ont été optimisées afin d'obtenir des signaux de fluorescence du même ordre de grandeur pour toutes les lésions présentes sur la puce. Cependant, la nature et la quantité de nucléotides fluorescents incorporés lors de la réaction d'ER sont dépendantes de la nature des lésions présentes et de la voie de réparation concernée. Par exemple, les photoproduits et les diols de pyrimidine donnent lieu à des

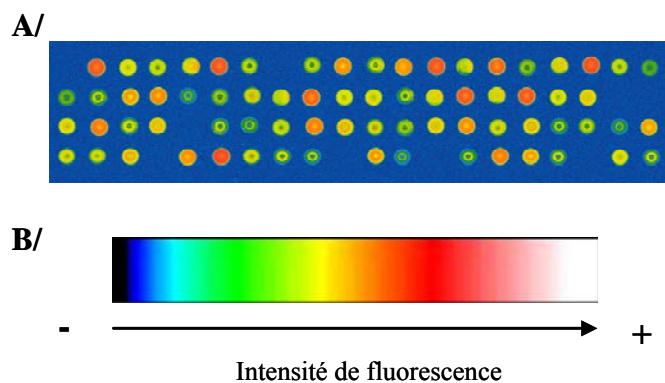


Figure 31: Image en fausses couleurs obtenue après lecture du signal fluorescent à 635 nm avec un gain réglé sur 460 (A/). Chaque disque de couleur correspond à un type de plasmide. Plus le disque est rouge plus l'incorporation de Cy5-CTP a été importante. B/ Echelle de couleur correspondant à l'intensité de fluorescence du pixel

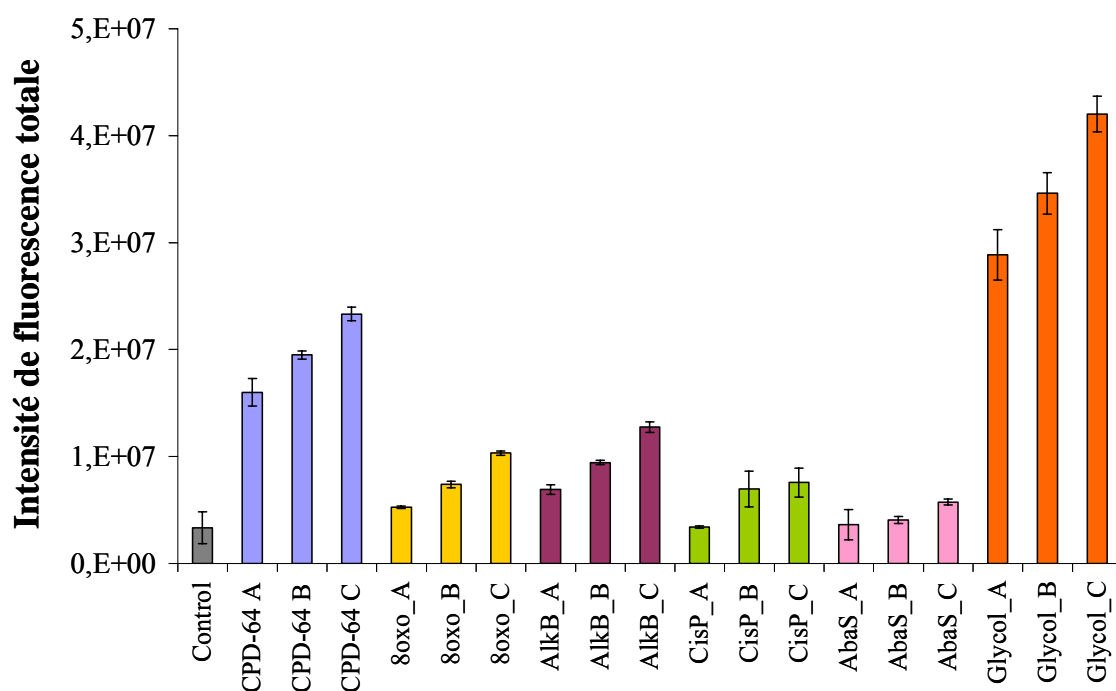


Figure 32: Profil d'excision-resynthèse obtenu après 2h de réaction d'un lysat témoin sur la puce plasmide. Ce profil correspond à la quantification de l'image obtenue dans la figure 1. Les 3 trois ratios quantité lésions/ quantité d'ADN (A, B et C) sont représentés pour chaque type de lésions.

intensités de fluorescence relativement élevées par rapport à ce qui est obtenu pour les sites abasiques ou les adduits cisplatine. Il s'agit donc de faire un compromis pour pouvoir mesurer les signaux au niveau de tous les plasmides modifiés et du plasmide contrôle présents sur la puce.

Nous mesurons l'incorporation du Cy5-dCTP dans l'ADN fixé sur le support. J.F. Millau a également réalisé des expériences en mesurant l'incorporation de Cy5-dGTP. La réparation de la 8-oxoG est associée à une plus forte intensité de fluorescence lorsque nous utilisons le Cy5-dGTP qu'avec le Cy5-dCTP ce qui est en faveur de l'incorporation d'un G à la place de la base lésée. Cependant, le bruit de fond obtenu avec le Cy5-dCTP est beaucoup plus faible qu'avec le Cy5-dGTP. Ainsi, nous avons fait le compromis d'avoir un signal fluorescent associé à chaque plasmide du support, tout en ayant le moins de bruit de fond possible.

III. Définition et illustration des paramètres mesurés sur la puce plasmide

A. Quantification des signaux de fluorescence

La **figure 31** présente une image en fausses couleurs obtenue après la lecture du signal fluorescent d'un pavé de la lame au bout de 2 h de réaction avec 0,3 mg/mL de protéines nucléaires. L'intensité correspondant à chaque dépôt de plasmide est ensuite quantifiée grâce à un logiciel (GenePix) (**Figure 32**). Chaque plasmide comportant un type de lésions est déposé sur le support en trois ratios lésions/ADN (A, B, C). Tous les dépôts contiennent la même quantité d'ADN, seule la quantité de lésions change : le ratio A correspond à la plus faible quantité de lésions, le ratio C correspondant à la plus forte quantité de lésions.

La figure 32 montre le profil d'excision-resynthèse obtenu avec un lysat de référence ; l'intensité de fluorescence totale obtenue pour chaque type de plasmide et pour chaque ratio lésions/ADN est représentée sur un histogramme. L'intensité de fluorescence totale correspond à la somme des intensités de fluorescence de l'ensemble des pixels contenus dans un dépôt de plasmide. Nous pouvons ainsi apprécier la corrélation entre ce ratio et le signal fluorescent à savoir que lorsque le ratio augmente (*ie.* la quantité de lésion augmente), la fluorescence augmente aussi.

Dans la plupart des résultats présentés ci-après, l'intensité de fluorescence a été sommée pour les trois ratios (A, B et C) d'un même type de plasmide. Ainsi, dans un souci de

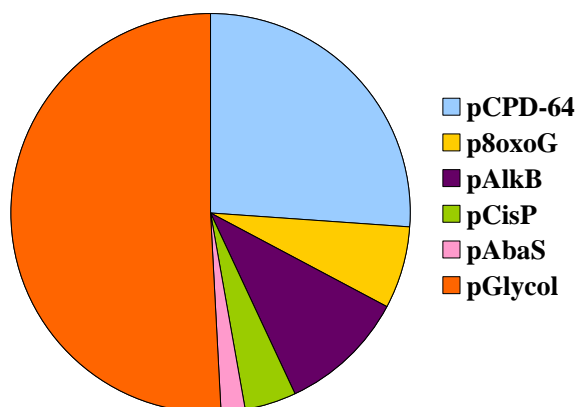


Figure 33: Répartition de l'excision-resynthèse des différentes lésions obtenue après 2h de réaction d'un lysat témoin sur la puce plasmide. Ce profil correspond à la quantification de l'image obtenue dans la figure 1. Pour chaque type de lésions, les intensités de fluorescence obtenues pour les 3 trois ratios quantité lésions/ quantité d'ADN (A, B et C) ont été sommées.

clarté, la réparation effectuée au niveau d'une lésion donnée est représentée par une seule valeur.

Les résultats présentés dans cette thèse sont exprimés soit comme l'intensité de fluorescence totale obtenue pour chaque type de lésions et chaque ratio lésions/ADN soit comme un pourcentage de l'intensité de fluorescence totale d'un lysat de référence. Le lysat de référence est préparé à partir des cellules témoin c'est-à-dire ne présentant pas de déficience pour la réparation de l'ADN. Le niveau de fluorescence obtenu pour le lysat de référence est alors fixé à 100 %, et les intensités de fluorescence des autres lysats sont exprimées par rapport au lysat témoin.

B. Définition du phénotype réparation

Le but de l'étude est de caractériser des phénotypes de réparation de l'ADN de différentes lignées XP. Nous entendons par phénotype, la signature en termes d'activités d'ER obtenues avec notre test multiplexé. Pour établir un phénotype de réparation, nous analysons tout d'abord le profil d'ER c'est-à-dire l'histogramme de l'intensité de la fluorescence totale obtenue pour les différents plasmides présents sur le support (Figure 32). Nous regardons également comment sont réparties les activités d'ER des différentes lésions. Nous appelons ceci la répartition de la réparation des différentes lésions (**Figure 33**). Nous représenterons sous forme de camembert, la part relative d'ER prise par chaque lésion.

En conclusion, le phénotype de réparation de l'ADN comme nous l'entendons, ici, tient compte à la fois de l'intensité du signal correspondant à une efficacité globale de réparation et de la répartition de l'ER par rapport aux différentes lésions.

C. Le niveau de fluorescence du plasmide contrôle

Le signal obtenu pour le plasmide contrôle montre la part de la réparation non spécifique qui a lieu pendant la réaction enzymatique. Le niveau de fluorescence obtenu pour ce plasmide contrôle est cependant inférieur à celui obtenu pour les différents plasmides comportant des lésions. Nous avons vérifié que les éventuelles lésions présentes dans ce plasmide contrôle (6-4 PPs, CDPs, Glycol, 8-oxoG, Ethénoguanine et Ethénoadénine) sont en quantité inférieure à ce qui est retrouvé dans les plasmides comportant des lésions spécifiques (Millau *et al.*, 2008b).

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer le signal fluorescent incorporé au niveau du plasmide contrôle. Tout d'abord, les plasmides (contrôle et comportant des lésions) sont

préparés et purifiés de telle façon qu'au minimum 85 % soient dans leur forme circulaire super-enroulée. Ainsi, au maximum 15% des lots de plasmides sont dans leur forme circulaire relaxée. Or, la forme relaxée, contient par définition des cassures simples brins, susceptibles de donner lieu à une incorporation de fluorescence.

De plus, ce faible niveau d'excision-resynthèse peut être dû à la part de la réparation dite gratuite. En effet, il a été montré que les systèmes de réparation pouvaient avoir une activité non-spécifique sur de l'ADN non-endommagé (Branum *et al.*, 2001). Enfin, nous pouvons supposer que le lysat contient des nucléases pouvant conduire à des cassures inopinées de l'ADN fixé sur le support. Les ADN polymérases peuvent ensuite resynthétiser l'ADN en incorporant le nucléotide fluorescent. A noter que ce dernier niveau de fluorescence devrait être identique dans les plasmides comportant des lésions et dans le plasmide contrôle.

Dans la plupart des résultats présentés ci-après, l'intensité de fluorescence obtenue avec le plasmide contrôle a été retranchée à l'intensité de fluorescence obtenue pour un plasmide comportant un type de lésion donnée. Nous avons choisi de soustraire l'intensité obtenue pour le plasmide contrôle pour ne montrer que l'ER qui a lieu de façon spécifique sur la lésion considérée. La soustraction est réalisée pour chaque ratio lésion/ADN. Dans le cas où les intensités de fluorescence des différents ratios sont sommées, l'intensité obtenue pour le plasmide contrôle est retranchée avant de faire la somme.

IV. Variabilité des intensités de fluorescence entre les expériences

Nous devons faire face à une variabilité entre nos expériences réalisées sur la puce plasmide. En effet, d'une expérience à l'autre, les intensités de fluorescence peuvent fluctuer. Plusieurs raisons sont à l'origine de cette variabilité et nous allons voir comment nous pouvons la maîtriser.

Les lames nous servant de support sont conditionnées par lot de 25 lames. Nous avons observé à plusieurs reprises une variabilité inter-lots de lames. La qualité du gel était contrôlée par le fournisseur (Perkin Elmer) mais d'un lot à l'autre, il se peut que la qualité ne soit n'est pas forcément rigoureusement la même. Les plasmides sont déposés le même jour, lors d'une même campagne de dépôts, sur toutes les lames d'un même lot. D'une campagne de dépôt à une autre, nous pouvons aussi avoir des différences (volume, taille des gouttes) ce qui impacte la reproductibilité des signaux de fluorescence obtenus. Deux lames provenant de deux lots différents pourront donc donner des signaux de fluorescence différents dus à la variabilité des gels et au dépôt des plasmides.

Nous avons également noté des différences de signaux de fluorescence entre deux expériences réalisées sur des lames d'un même lot mais avec des réactions d'ER menées à des jours différents. Il a été montré que l'ozone contenu dans l'atmosphère ambiante entraîne des variations du signal fluorescent (Branham *et al.*, 2007). En effet, le Cy5 est détruit par l'ozone de l'air. Ainsi, suivant les conditions atmosphériques régnant le jour de l'expérience, nous pouvons obtenir des intensités de fluorescence très variables avec le même lysat cellulaire et les mêmes conditions réactionnelles.

Bien que l'intensité de fluorescence totale varie d'une expérience à l'autre, nous nous assurons systématiquement que la part relative de la réparation des 6 lésions reste constante. En effet, nous vérifions que le camembert représentant la part prise par la réparation de chaque lésion soit le même d'une expérience à l'autre. De cette façon, nous nous assurons de la bonne conduite de l'expérience en dépit de la variabilité du signal.

D'autre part afin de standardiser notre test, chaque série d'expériences mises en œuvre au laboratoire est réalisée systématiquement en présence d'un lysat nucléaire de cellules HeLa. Ce lysat commercial, reçu en grande quantité (20 mL) et stocké en aliquots nous sert d'extrait de référence. Les résultats obtenus avec cet extrait nous permettent d'une part de déterminer la variabilité inter-expérience et d'autre part de normaliser nos résultats entre eux. Dans notre étude, le lysat de cellules témoin (*ie.* non déficientes pour la réparation de l'ADN) constitue notre lysat de référence.

Chapitre II

Partie II

Etude préliminaire à partir du
modèle siRNA

Notre stratégie a consisté dans un premier temps à explorer le sujet à partir d'un modèle artificiel à savoir des cellules HeLa siRNA. Le système siRNA permet l'extinction de l'expression d'un gène spécifique. Dans notre cas, les cellules HeLa ont été transfectées avec un vecteur codant pour un ARN interférence (siRNA) permettant d'annuler l'expression soit du gène *XPA* soit du gène *XPC*. Ces lignées cellulaires ont été établies par le Dr. Denis Biard (Biard *et al.*, 2005). Le vecteur EBV qui est transfecté dans les cellules HeLa permet une expression stable du vecteur et une extinction à long terme (plusieurs centaines de jours) de l'expression du gène ciblé. Ainsi, dans notre cas il n'y aura pas de protéine XPA ou XPC dans les cellules correspondantes.

Le modèle siRNA a été choisi pour sa commodité de culture et la facilité d'obtention de ces cellules. De par l'expression stable du vecteur, ces cellules peuvent être cultivées pendant plusieurs mois tout en conservant le phénotype éteint, ce qui permet de préparer un grand nombre de culots cellulaires pour pouvoir ensuite étudier la réparation sur la puce plasmide. Par ailleurs, nous avons choisi de commencer l'étude avec ce modèle pour s'affranchir de l'effet du patrimoine génétique sur la réparation. En effet, ici, toutes les lignées obtenues ont été construites à partir du modèle HeLa et possèdent donc toutes le même génotype. Ce n'est pas le cas, par exemple, quand nous utilisons des cellules issues de patients XP : toutes les lignées sont alors issues de fonds génétiques différents correspondant aux différents patients. Enfin, les lignées HeLa siRNA présentent une extinction totale de l'expression du gène ciblé. Contrairement aux cellules pouvant provenir de patients XP, où la protéine de la réparation peut être soit absente, soit partiellement tronquée, ici la protéine ciblée est totalement absente. Ainsi, le modèle HeLa siRNA permet de s'affranchir de la variabilité génotypique et donc phénotypique régnant au sein de la maladie XP.

Nous voulions commencer nos études avec un modèle simple modélisant la maladie complexe du Xeroderma pigmentosum. Les cellules HeLa siRNA ont donc été utilisées dans un but exploratoire. Il s'agissait d'avoir un premier aperçu de ce que nous pouvions obtenir en termes d'activités de réparation de l'ADN de cellules XP.

Les profils de réparation ont tout d'abord été étudiés au niveau basal (*ie.* sans traitement génotoxique) à partir de lysats nucléaires de HeLa siRNA. Les conditions de préparation des lysats nucléaires ainsi que les conditions expérimentales pour le test *in vitro* sur puce avaient été optimisées par J.F Millau (Millau *et al.*, 2008b). Nous nous sommes donc appuyés sur ces conditions pour débiter l'étude.

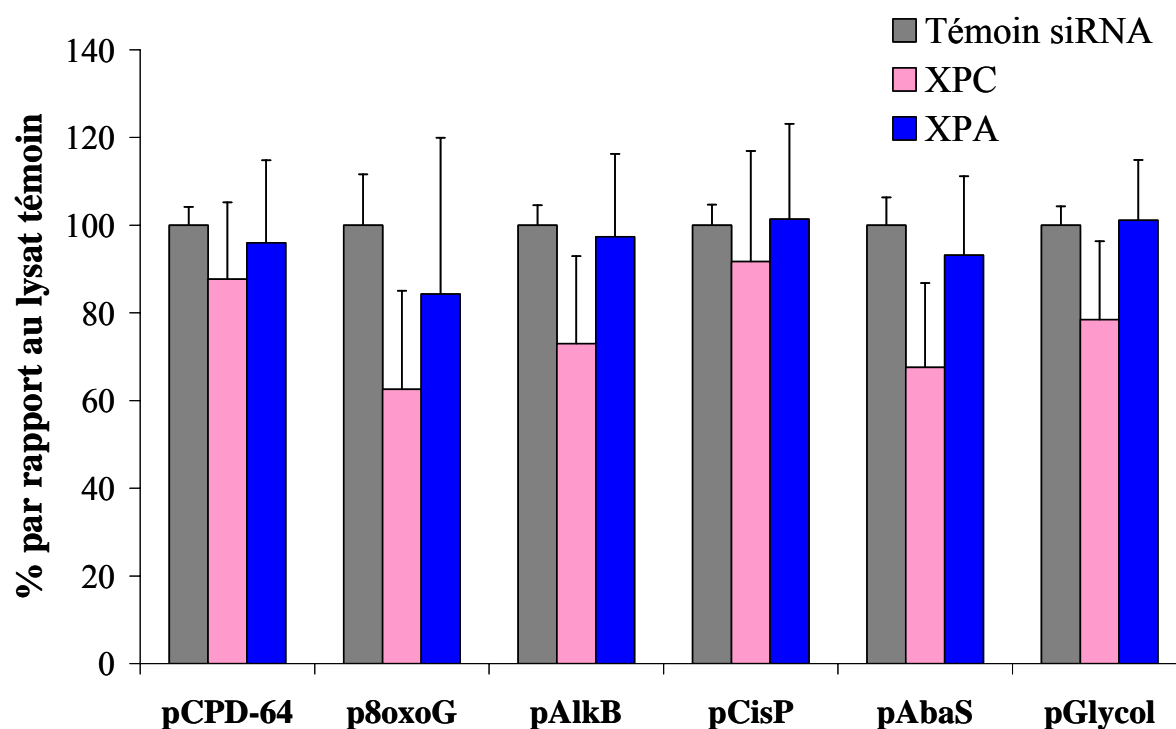


Figure 34: Niveau relatif d'excision-resynthèse de lysats nucléaires HeLa siRNA déposés à 0,4 mg/mL de protéines (moyenne de 6 expériences indépendantes). Pour chaque lysat XP, l'intensité totale de fluorescence est exprimée en pourcentage de l'intensité de fluorescence du lysat témoin. L'intensité de fluorescence du lysat témoin est fixée à 100%.

I. Caractérisation d'activités de réparation de l'ADN au niveau basal

Les premières expériences ont été réalisées sur la puce plasmide en présence de 0,4 mg/mL de protéines nucléaires de HeLa siRNA pendant 2 h à 30 °C.

Nous avons réalisé six expériences indépendantes avec le modèle siRNA. Pour chaque expérience, nous avons exprimé l'intensité de fluorescence obtenue pour un lysat XP en pourcentage par rapport au lysat de référence à savoir le lysat de cellules normales. Le niveau d'excision-resynthèse du lysat témoin est fixé à 100 %. Les six pourcentages ainsi calculés ont ensuite été moyennés afin d'obtenir un profil relatif (*ie.* par rapport au lysat témoin) pour chaque lysat nucléaire XP (A et C) (**Figure 34**).

Le niveau de réparation obtenu avec le lysat XPC est inférieur au niveau obtenu pour le lysat témoin pour les lésions 8-oxoG, les bases alkylées, les sites abasiques et les diols de pyrimidines. Le lysat XPC répare ces lésions en moyenne à 71 % par rapport au lysat témoin. La déficience pour la réparation des lésions normalement prises en charge par la voie BER, est en accord avec les nombreuses études révélant le rôle de XPC dans la réparation de ce type de lésions. De façon surprenante, le lysat XPC présente la même activité que le lysat témoin pour les deux lésions spécifiques de la voie NER à savoir les photoproduits et les adduits cisplatine. Ces niveaux d'ER obtenus avec le lysat XPC pour les deux lésions spécifiques de la NER vont à l'encontre des résultats de la littérature.

Le lysat XPA quant à lui, présente une activité d'ER équivalente à celle du lysat témoin et ceci pour toutes les lésions. Ainsi lorsque la réaction d'excision-resynthèse est réalisée avec 0,4 mg/mL de protéines nucléaires, aucune différence dans les activités de réparation n'est détectée sur la puce plasmide entre un lysat témoin et un lysat de cellules déficientes pour XPA. Ce résultat est, là aussi, surprenant et va à l'encontre des résultats de la littérature. En effet, il est généralement obtenu un faible niveau (10 %) de réparation avec des lysats XPA par rapport au lysat témoin (Masutani *et al.*, 1993).

	voie NER		NER/BER	voie BER		
	pCPD-64	pCisP	pAlkB	p8oxoG	pAbaS	pGlycol
Témoin siRNA	100 (+/- 4)	100 (+/- 5)	100 (+/- 5)	100 (+/- 12)	100 (+/- 6)	100 (+/- 4)
XPA	96 (+/- 19)	101 (+/- 22)	97 (+/- 19)	84 (+/- 36)	93 (+/- 18)	101 (+/- 14)
XPC	88 (+/- 18)	92 (+/- 25)	73 (+/- 20)	63 (+/- 22)	68 (+/- 19)	78 (+/- 18)

Tableau 7 : Niveaux d’excision-resynthèse obtenus pour les lysats de cellules siRNA XPA et XPC exprimés par rapport au lysat témoin

Le tableau ci-dessus (**Tableau 7**) récapitule les différents niveaux d’activités de réparation obtenus pour les deux lysats XP et pour toutes les lésions présentes sur la puce.

En conclusion, avec notre test *in vitro*, nous obtenons un résultat surprenant à savoir que le lysat nucléaire de cellules XPA^{-/-} présente la même activité d’excision-resynthèse que le lysat de cellules témoin. Le profil de réparation du lysat XPC est différent, puisque l’activité de ce lysat est plus faible que celle du lysat témoin pour certaines lésions uniquement. Cependant, pour ce lysat également, le profil de réparation obtenu est inattendu par rapport aux résultats de la littérature puisque les lésions prises en charge par la NER sont réparées aussi bien par un lysat témoin que par un lysat XPC.

Nous nous sommes donc interrogés sur les raisons de ces résultats surprenants. Tout d’abord, la comparaison systématique de l’ER obtenue pour un plasmide comportant une lésion avec le plasmide contrôle montre que la mesure n’est pas due à une réaction non spécifique. Ainsi, le niveau élevé observé pour le lysat XPA n’est pas dû à un artefact lié à l’expérience. Afin de trouver une piste d’investigation, nous avons analysé dans la littérature comment sont réalisés les tests *in vivo* montrant une déficience de la réparation dans les cellules XP. Lors du test UDS, la réparation est mesurée après une irradiation UV des cellules conduisant à la formation de lésions prises en charge par la voie NER. Ce type de lésions n’étant pas réparé dans les cellules XP, l’incorporation de nucléotides radioactifs lors de la resynthèse est donc plus faible dans ces cellules par rapport aux cellules témoin.

Nous avons vu que le niveau basal de réparation ne nous permettait pas de discriminer les phénotypes de réparation du lysat témoin des lysats XP. Qu’en est-il après une irradiation

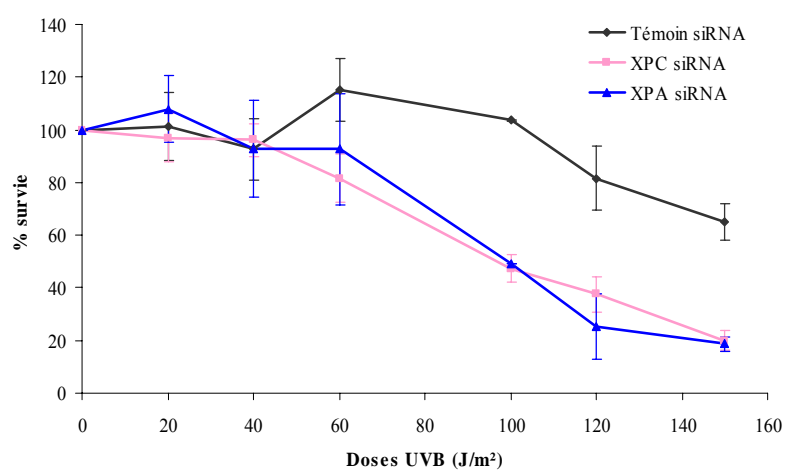


Figure 35: Courbes de cytotoxicité 24h après l'irradiation UVB des cellules HeLa siRNA

UV des cellules ? L'irradiation UV nous permet-elle de discriminer les phénotypes de réparation du lysat XPA par rapport au témoin ? Nous avons suivi la même démarche que celle du test UDS à savoir étudier la réparation après une irradiation UV des cellules.

II. Caractérisation d'activités de réparation de l'ADN en réponse à un traitement génotoxique

L'effet des UV a d'abord été abordé au niveau cellulaire par l'étude de la cytotoxicité du traitement.

A. Survie cellulaire après une irradiation UVB

Nous avons utilisé le test MTT pour mesurer la cytotoxicité d'une irradiation UVB sur le modèle siRNA. Cette analyse nous permet de comparer les différentes réponses en terme de survie des différents souches (témoin, XPA^{-/-} et XPC^{-/-}).

La survie cellulaire est mesurée 24 h après l'irradiation UVB des cellules. Une étude préliminaire a permis de déterminer la gamme de dose à appliquer. 50% de cytotoxicité sont obtenus lorsque les cellules HeLa siRNA témoin sont irradiées à une dose comprise entre 150 et 200 J/m² (données non montrées). Les études de cytotoxicité ont été effectuées par la suite sur une gamme de doses entre 0 et 150 J/m². En effet, nous voulons mesurer des activités de réparation, en réponse à une irradiation UV n'entraînant pas plus de 50 % de cytotoxicité.

Comme nous pouvons l'observer sur la **figure 35**, les cellules témoins sont moins sensibles au traitement que les cellules XP. Les courbes de survie des cellules HeLa siRNA XPA et XPC se superposent reflétant ainsi une sensibilité identique aux UVB pour les deux groupes de complémentation.

En conclusion, la dose létale 50 (DL50) est obtenue pour une dose supérieure à 150 J/m² pour les cellules témoins et pour une dose d'environ 100 J/m² pour les cellules siRNA XPA et XPC.

Nous souhaitons connaître l'impact de la cytotoxicité d'un traitement génotoxique sur les activités de réparation mesurées avec notre test. En effet, nous supposons qu'une population cellulaire présentant une forte cytotoxicité ne va pas réparer l'ADN de la même façon qu'une population faiblement affectée par ce même traitement. Les mécanismes mis en jeu ne seront pas les mêmes du fait de la quantité et de la nature des lésions impliquées et de

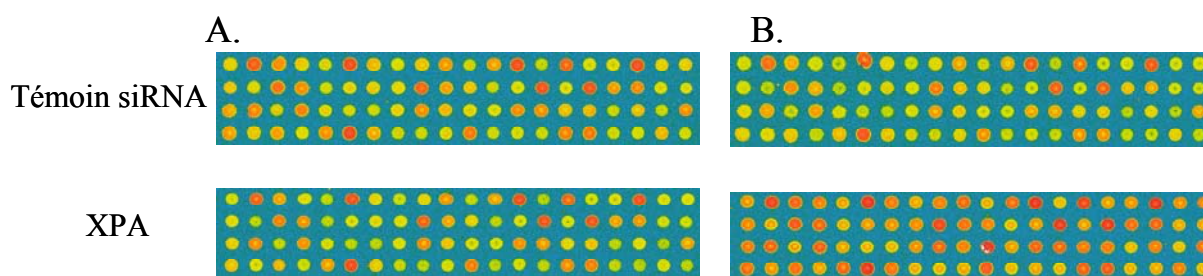


Figure 36: Images en fausses couleurs de l'intensité de fluorescence totale obtenue pour les lysats nucléaires témoin et XPA.

A/ Lysats de cellules non-irradiées

B/ Lysats de cellules irradiées à 80 J/m²

l'état physiologique de la cellule après le traitement. Il a par exemple été montré qu'après une irradiation UVB de fibroblastes primaires à 500 J/m² (cytotoxicité de 30 %), la cinétique de réparation de différents photoproduits n'est pas la même que si les cellules ont été irradiées avec 50 J/m², dose très peu cytotoxique (Courdavault *et al.*, 2004b).

B. Activité de réparation de l'ADN en réponse à une irradiation UV

Nous avons constaté que les lysats de cellules HeLa siRNA XPA et XPC, irradiées à une dose entraînant environ 50 % de cytotoxicité (80 J/m²), présentent des activités non spécifiques d'ER. Le niveau de fluorescence pour ces deux lysats augmente fortement lorsque les cellules sont irradiées avec 80 J/m² (**Figure 36**) mais nous observons que cette augmentation est non spécifique, puisque le niveau d'ER du plasmide contrôle augmente lui aussi grandement. Une hypothèse serait que les cellules XP, plus sensibles que les cellules témoin à une irradiation UV, initieraient des processus d'apoptose à une dose de 80 J/m². Une des caractéristiques de l'apoptose est la fragmentation de l'ADN par des nucléases, pour former des fragments de taille spécifique (multiple de 180 pb). Ces nucléases sont activées lors de l'apoptose (Samejima *et al.*, 2005). Ainsi, l'apoptose pourrait se traduire sur la puce plasmide par des incisions non-spécifiques de l'ADN fixés, par les nucléases du lysat de cellules ayant déclenchées la voie de l'apoptose. Les polymérases contenues dans le lysat pourraient alors ensuite incorporer des nucléotides fluorescents au niveau de ces sites.

Ainsi, lorsque le traitement entraîne 50 % de létalité, la réponse en termes d'activités d'ER, mesurée avec notre test, est aspécifique. Nous avons donc fait le choix de travailler avec des doses d'UVB n'entraînant que très peu de mortalité cellulaire (< 15 %) pour ne pas biaiser la réponse observée sur la puce.

Les cellules HeLa siRNA ont donc été irradiées à des doses comprises entre 5 et 20 J/m². Nous avons analysé le niveau d'ER sur la puce plasmide 24 h après l'irradiation. La réaction d'excision-resynthèse a été réalisée avec 0,4 mg/mL de protéine nucléaire et a duré 2 h à 30 °C. L'intensité de fluorescence totale obtenue pour le lysat de cellules irradiées est exprimée par rapport à celle obtenue avec le lysat de cellules non-irradiées (pourcentage de variation entre l'échantillon irradié et le non-irradié).

L'analyse de ces pourcentages de variation de l'intensité de fluorescence après une irradiation des cellules témoins avec 5 J/m², montre une stimulation de l'excision-resynthèse

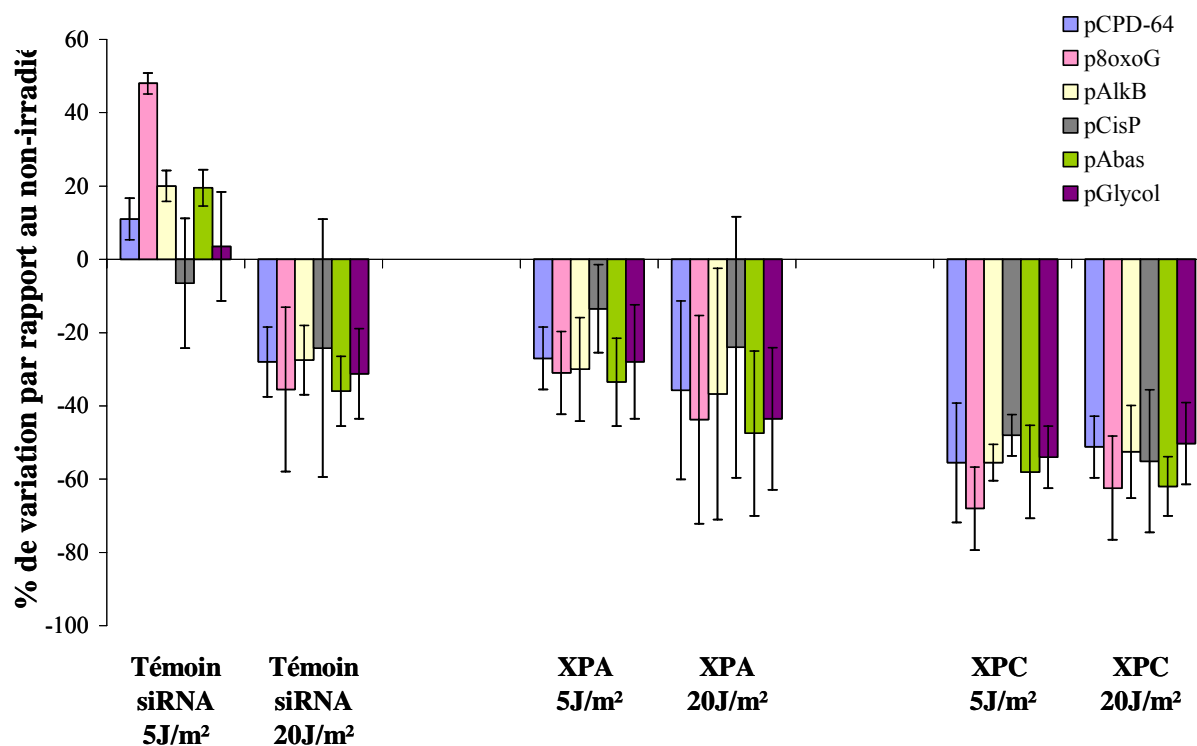


Figure 37: Pourcentage de variation de l'excision-resynthèse, en présence de 0,4 mg/mL de protéines, entre le lysat de cellules irradiées et le lysat de cellules non-irradiées (moyenne de 4 expériences indépendantes). Pour chaque lysat de cellules irradiées à 5 et 20J/m² d'UVB, a été calculé un pourcentage de variation de l'intensité totale de fluorescence par rapport au lysat préparé sur des cellules non-irradiées

du lysat de cellules irradiées par rapport au lysat de cellules non irradiées (**Figure 37**). En effet, nous pouvons observer que le pourcentage de variation est positif, l'intensité de fluorescence du lysat de cellules témoin irradiées avec 5 J/m² est plus élevée que celle du lysat de cellules témoin non-irradiées. Cette stimulation est particulièrement prononcée pour la lésion 8-oxoG en comparaison avec les autres lésions : l'incorporation de nucléotide fluorescent est augmentée d'environ 50 % pour cette lésion en réponse à une irradiation UVB. En revanche, la stimulation observée pour les photoproduits (environ 10 %) est relativement faible comparée aux autres lésions et elle ne concerne ni les diols de pyrimidine ni les adduits cisplatine. Ainsi, la stimulation des activités de réparation en réponse à une irradiation UVB concerne paradoxalement essentiellement les dommages pris en charge par la BER. En effet, nous aurions pu nous attendre à une stimulation majoritaire de la réparation des lésions spécifiques de la NER à savoir les photoproduits et les adduits cisplatine.

Il est à noter que l'augmentation de l'incorporation de nucléotides fluorescents dans l'ADN du support n'est pas due à une augmentation de la réparation non-spécifique puisque l'intensité de fluorescence du plasmide contrôle n'augmente pas (données non montrées).

Contrairement à ce qui est observé avec la dose de 5 J/m², lorsque les cellules témoins sont irradiées avec 20 J/m², la stimulation des activités d'ER n'est plus observée. En effet, le niveau de réparation de l'ensemble des lésions présentes sur la puce chute lorsque les cellules ont été irradiées à cette dose. Les mécanismes de réponse au stress, mis en place suite à l'irradiation, sont différents après une irradiation aux deux doses de 5 et 20 J/m². Selon la quantité mais aussi la nature des lésions formées par l'irradiation UVB, les réponses sur la puce en terme d'activités de réparation ne sont donc pas les mêmes. Nous pouvons penser qu'à la plus faible dose, la cellule n'a pas besoin de s'arrêter pour réparer les lésions induites alors qu'après 20 J/m², la cellule a besoin de faire une pause dans le cycle pour mettre en place une réponse adaptée. Ainsi, les activités de réparation que nous voyons stimulées 24 h après une irradiation des cellules avec 5 J/m² ne le sont pas si les cellules ont été irradiées avec une dose plus forte.

Seule la dose de 5 J/m² conduit à une stimulation des activités de réparation et cet effet est toujours visible 24 h après l'irradiation. Ce résultat sera étayé, par la suite, avec le modèle fibroblaste où cette stimulation de la réparation sera confrontée à une analyse de la survie et du cycle cellulaire.

Contrairement à ce que nous avons vu avec les cellules témoins irradiées avec 5 J/m², lorsque les cellules XP sont irradiées aux faibles doses (5 et 20 J/m²), le niveau relatif (*ie.* par

rapport au non-irradié) d'ER des deux lysats XP diminue et ceci pour toutes les lésions (Figure 37). Ainsi, l'intensité de fluorescence obtenue avec un lysat XP de cellules irradiées est inférieure à l'intensité de fluorescence obtenue avec un lysat de cellules XP non-irradiées. La réparation est donc moins efficace dans les lysats XP après une irradiation des cellules.

En conclusion, la réponse des cellules HeLa siRNA aux UVB montre une stimulation de l'excision-resynthèse du lysat nucléaire témoin lorsque les cellules sont irradiées avec 5 J/m² d'UVB. Cette stimulation ne concerne pas les lysats XP, l'irradiation a, au contraire, un effet inhibiteur sur les activités de réparation.

L'irradiation à de faibles doses d'UVB, peu cytotoxiques, permet l'obtention de réaction de réparation spécifique dans nos conditions expérimentales. Cette analyse aux faibles doses d'UVB montre que la réponse est différente pour les cellules témoins et les cellules XP.

Cette première approche avec le modèle HeLa siRNA a permis de dégager une hypothèse : dans nos conditions expérimentales, le niveau basal n'est pas informatif pour différencier les signatures en termes d'activités de réparation entre un lysat témoin et un lysat XP. En revanche, nous montrons que la réponse est différente pour un phénotype normal par rapport à un phénotype XP lorsque les cellules ont été traitées aux UV. Les UV entraînant des lésions spécifiquement réparées par la voie NER, et les cellules XP étant déficientes pour cette voie de réparation, il est assez logique de mettre en évidence des réponses divergentes en terme d'activités de réparation entre un lysat témoin et un lysat XP lorsque les cellules ont été traitées au préalable par des UVB. Nous observons également, que les activités spécifiques de la BER sont également stimulées dans le lysat témoin en réponse à l'irradiation UVB. Afin d'explorer cette hypothèse de façon plus précise, nous avons choisi d'analyser, par la suite, les phénotypes de réparation de l'ADN de lignées fibroblastiques obtenues à partir de patients XP (Institut Gustave Roussy, équipe du Pr. Alain Sarasin).

Chapitre II

Partie III

Etude à partir de lignées de
fibroblastes de patients XP

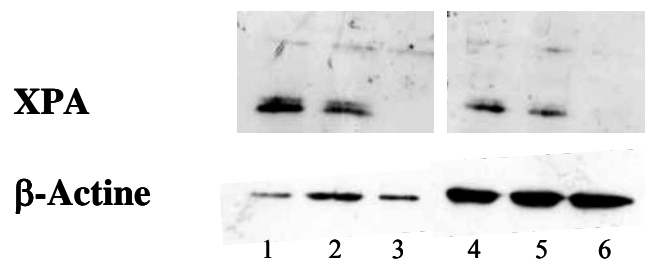


Figure 38: Détection de la protéine XPA dans différents lysats de fibroblastes.

1 à 3: lysats nucléaires (1/ Témoin; 2/ XPC; 3/ XPA). **4 à 6:** lysats totaux (4/ Témoin; 5/ XPC; 6/ XPA). La « bande XPA » est située entre la bande 35 et la bande 49 kDa du marqueur de poids moléculaire (PM théorique de XPA: 31 kDa) et la « bande contrôle actine » est située approximativement au même niveau que la bande 49 kDa du marqueur de poids moléculaire (PM théorique de l'actine: 45 kDa).

I. Caractérisation d'activités de réparation de l'ADN au niveau basal

A. Caractérisation des lysats cellulaires

Nos tests *in vitro* permettent la mesure d'activité de réparation à partir de lysats cellulaires. Nous avons travaillé majoritairement avec des lysats nucléaires mais comme nous le verrons par la suite, nous avons aussi réalisé une expérience avec des lysats totaux. La présence de la protéine XPA a été contrôlée dans les différents lysats préparés par analyse par Western-Blot. La qualité de notre anticorps dirigé contre la protéine XPC ne nous a pas permis de caractériser nos lysats vis-à-vis de cette protéine.

Nous avons contrôlé le dépôt des protéines dans le gel par la recherche de la protéine β -actine (**Figure 38**). En effet, cette protéine répond à une synthèse ubiquitaire et est généralement utilisée comme témoin de la présence effective de protéines sur la membrane de Western-Blot. Le contrôle β -actine permet de vérifier si les dépôts contiennent bien tous la même quantité de protéines. Ainsi, nous observons que, pour chaque lysat nucléaire, et pour chaque lysat total, la même quantité de protéine a été déposée. De plus, la β -actine est en plus grande quantité dans les lysats totaux (puits 4 à 6) par rapport aux lysats nucléaires (puits 1 à 3). En effet, cette protéine a une localisation majoritaire dans le cytoplasme mais elle peut être également retrouvée dans le noyau (Wada *et al.*, 1998).

Comme nous pouvons le voir sur la figure 1, la protéine XPA est présente dans des lysats nucléaires et totaux de fibroblastes témoins. Le poids moléculaire de la bande correspondant à la protéine XPA est supérieur au poids théorique de 31 kDa, ce qui a déjà été décrit (Yang *et al.*, 2002). De plus, la bande correspondant à la protéine XPA est dédoublée ce qui a déjà été montré et attribué aux différents états redox de la protéine (Robins *et al.*, 1991). Ce dédoublement est observé lorsque la protéine XPA est purifiée en présence d'une forte concentration saline (500 mM) (Liu *et al.*, 2005). Rappelons, que dans un lysat nucléaire préparé dans nos conditions expérimentales, la concentration en KCl est de 400 mM. Comme attendu, la protéine XPA est également présente dans les lysats de fibroblastes XPC. A l'inverse, la figure 38 permet de confirmer que la protéine XPA est absente dans les lysats nucléaire et total de fibroblastes XPA. La souche XP12ROSV utilisée pour l'étude correspond

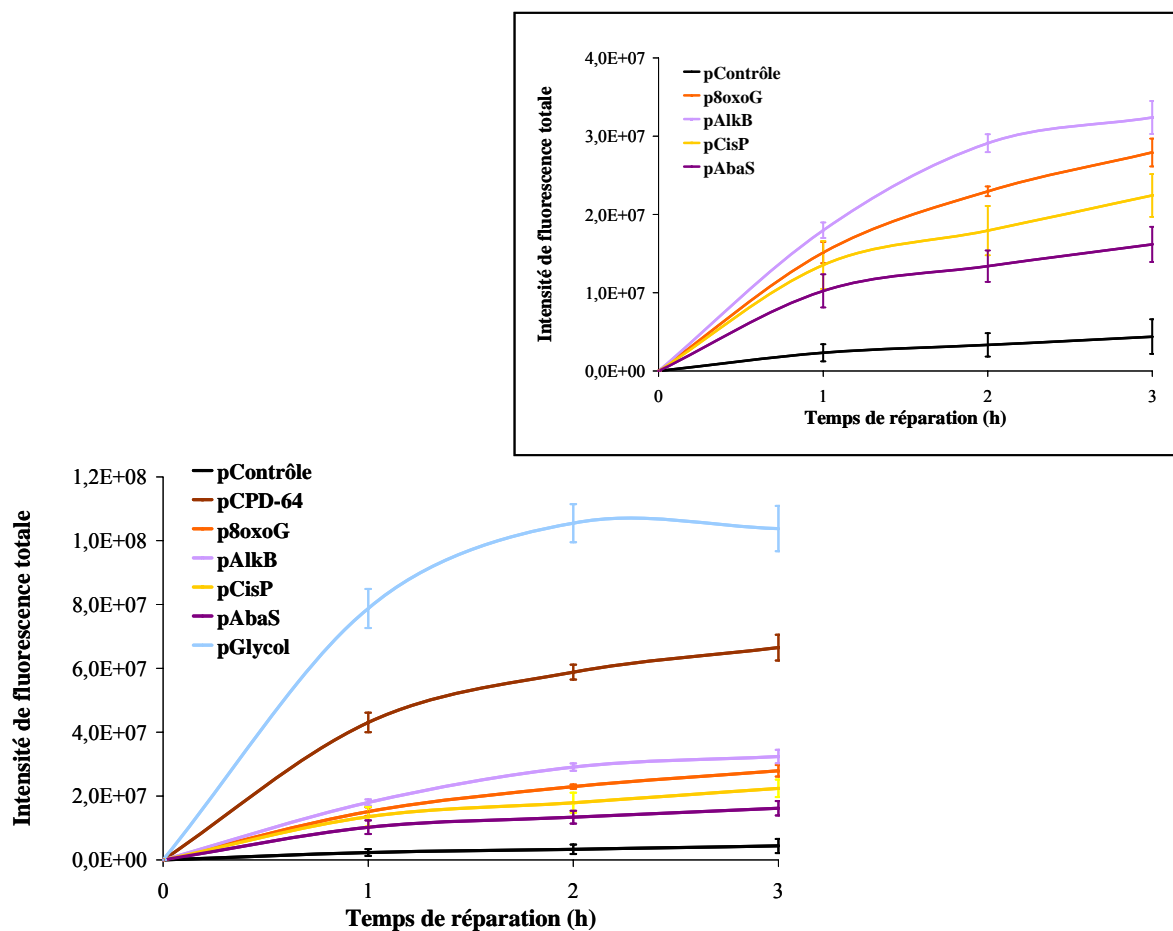


Figure 39: Cinétique d'excision-resynthèse (1 à 3 h) obtenue avec 0,3 mg/mL de lysat nucléaire de fibroblastes témoin. Les deux graphes montrent les résultats obtenus pour la même réaction mais ils sont représentés selon deux échelles différentes d'intensité de fluorescence. Ainsi, le graphe dans l'encadré montre uniquement les lésions pour lesquelles le signal fluorescent est plus faible.

à une mutation non-sens dans le codon V. Il est donc attendu d'obtenir un lysat dépourvu de cette protéine.

La figure 38, nous renseigne aussi sur la localisation cellulaire de la protéine XPA. En effet, dans nos conditions de lyse, la protéine XPA est présente dans le noyau. Cette observation est en contradiction avec la localisation cellulaire de XPA décrite dans le chapitre I (IV. C. 2. b.), où il a été montré que XPA se situe essentiellement dans le cytoplasme. Cependant, la localisation de cette protéine ne semble pas clairement définie puisque la localisation majoritairement nucléaire de XPA a également été mentionnée dans la littérature (Miura *et al.*, 1991).

B. Mesure d'activités d'excision-resynthèse

1. Excision-resynthèse d'un lysat nucléaire témoin

Nous allons nous intéresser dans un premier temps uniquement aux activités d'ER du lysat témoin.

a) Cinétique d'excision-resynthèse

Nous étudions ici la cinétique de la réaction d'excision-resynthèse. Pour cela, les expériences sont arrêtées à différents temps (1, 2 ou 3 h). Les graphiques de la **figure 39** présentent l'intensité de fluorescence au cours du temps, obtenue pour un lysat nucléaire témoin à la concentration de 0,3 mg/mL. Les courbes de cinétique sont représentées pour chaque plasmide comportant un type de lésion ainsi que pour le plasmide contrôle. Les intensités de fluorescence des différents ratios lésions/ADN (A, B et C) ont été sommées. L'encadré en haut à droite est un grossissement du graphe principal permettant d'apprécier correctement les courbes de cinétiques de réparation des lésions dont le signal fluorescent est plus faible.

Comme cela était attendu, plus la réaction d'excision-resynthèse dure dans le temps, plus l'intensité de fluorescence est élevée (Millau *et al.*, 2008b). Cependant les courbes de cinétiques ne décrivent pas des droites. En effet, l'incorporation de nucléotide fluorescent ralentit entre 2 et 3 h lorsque la réaction est conduite avec 0,3 mg/mL de protéines nucléaires. De plus, les cinétiques diffèrent d'une lésion à l'autre. Alors que la phase plateau est largement atteinte après 2 h de réaction pour la réparation des diols de pyrimidine, elle l'est de façon moins prononcée pour les autres lésions. La vitesse initiale de la réaction d'excision resynthèse de cette lésion est la plus forte. La vitesse initiale d'ER des photoproduits est

inférieure mais elle reste encore largement supérieure à celles observées pour les autres lésions à savoir la 8-oxoG, les bases alkylées, les sites abasiques et les adduits cisplatine. Enfin, pour la 8-oxoG, la cinétique est quasiment linéaire. Cette constatation confirme les résultats de J.F Millau obtenus avec un extrait HeLa.

En conclusion, les cinétiques obtenues avec 0,3 mg/mL de protéines d'un lysat de fibroblastes témoin sont différentes pour chaque lésion considérée. Cependant, nous observons généralement un ralentissement de la vitesse d'ER dès 2 h de réaction. La réaction menée sur le support se sature et atteint un point d'équilibre. Ceci suggère que certaines protéines de la réparation deviennent limitantes au cours de la réaction. Sont-elles dégradées ou sont-elles indisponibles pour une nouvelle réaction ?

Pour la suite, lorsque nous comparons les activités de réparation des lysats XP par rapport à celles du témoin, nous avons choisi de nous placer à 2 h de réaction, là où les courbes de cinétiques atteignent leur maximum, juste avant le plateau.

b) Effet de la concentration en protéines lors de la réaction d'excision-resynthèse

Nous avons, ensuite, cherché à connaître l'effet de la concentration protéique lors de la réaction d'ER conduite sur support. En effet, suivant les différents ratios existants entre la quantité de protéines, la quantité d'ADN, et la quantité de lésions, nous pouvons penser que les mécanismes enzymatiques ne seront pas les mêmes. Avant d'étudier les activités de réparation obtenues avec les différentes conditions de concentrations protéiques testées, il est important de situer notre test par rapport au test de référence vis à vis de ce paramètre.

Dans la littérature, le test *in vitro*, pris comme référence pour notre étude, est réalisé, en général, avec 80 à 150 µg de protéines de lysat cellulaire total pour une quantité d'ADN de 600 ng (300 ng de plasmide lésé et 300 ng de plasmide contrôle) (Wood *et al.*, 1988; Hansson *et al.*, 1990; Robins *et al.*, 1991; Barret *et al.*, 1996; Jaiswal *et al.*, 1998). Une autre expérience réalisée avec un lysat, cette fois-ci, nucléaire, fait réagir 200 µg de protéine avec 200 ng d'ADN lésé et 200 ng d'ADN intact (Calsou *et al.*, 1996b). Le ratio massique quantité de protéine / quantité d'ADN est alors de 500. Les auteurs étudient soit la réparation des photoproduits (10,8 dommages/plasmide) soit la réparation des adduits cisplatine (20 dommages/plasmide). Dans notre cas, les quantités de protéines ou d'ADN en jeu, sont bien plus faibles puisque nous utilisons entre 7,5 et 25 µg de protéines nucléaires pour une quantité

de 3,4 ng d'ADN fixé sur le support. Le ratio quantité de protéine / quantité d'ADN est donc compris entre 2200 et 7350.

Dans le test de référence décrit par Wood *et al.*, le traitement UV du plasmide réalisé, produit 12 dimères de pyrimidines (CDPs) par plasmide. Dans notre cas, nous créons beaucoup plus de photoproduits, environ 60 photoproduits par plasmide. De plus, le lysat réagit également avec 4 bases oxydées 8-oxoG par plasmide, 11 bases alkylées, 8 adduits cisplatine, 0,5 sites abasiques et 1 diol de pyrimidine (Millau *et al.*, 2008b). Ainsi, par rapport à la méthode de référence, notre test *in vitro* déplace l'équilibre protéine/lésions vers la quantité de substrat, puisque dans notre cas, le ratio quantité de protéines / quantité de lésions est 2 à 3 fois plus faible que dans la méthode de référence lorsque que nous réalisons la réaction d'ER à faible concentration. Cependant, lorsque nous augmentons la quantité de protéines nous arrivons à des ratios similaires de ce qui se fait dans le test de référence.

Il est, néanmoins, difficile de comparer notre test sur support avec ce qui se fait en solution. En effet, le substrat est, ici, moins disponible qu'en solution, puisque celui-ci est fixé sur le support et il est, de plus, concentré sur des zones de dépôt. Lors d'une réaction en solution, les molécules (enzymes et substrats) sont « libres » et peuvent donc se déplacer dans le mélange. Les mouvements des molécules facilitent donc leurs rencontres et nous pouvons nous attendre à ce que les réactions enzymatiques se fassent plus facilement en comparaison avec ce qui se passe sur support.

Enfin, la réaction biochimique ayant lieu sur le support en présence de plusieurs substrats différents, nous pouvons nous attendre à mesurer des activités différentes de ce qui est obtenu dans le test de référence, où la réaction enzymatique a lieu en présence d'un seul substrat. Nous pouvons penser que les mécanismes enzymatiques, mis en jeu dans notre test, seront plus complexes que ceux, mis en place lors du test de référence, à cause des phénomènes de compétition enzymatique de par la présence des différents substrats.

i. Mode de préparation de lysat concentré

En référence à ce qui se fait dans la littérature au niveau des tests *in vitro* utilisant des extraits cellulaires, le lysat nucléaire est dilué par 5 dans le mélange réactionnel total, afin d'ajuster la concentration en KCl à la concentration optimale de 80 mM pour étudier la réparation. Ainsi, il est nécessaire de préparer des lysats suffisamment concentrés pour pouvoir ensuite mettre en place une réaction d'excision-resynthèse avec de fortes concentrations protéiques.

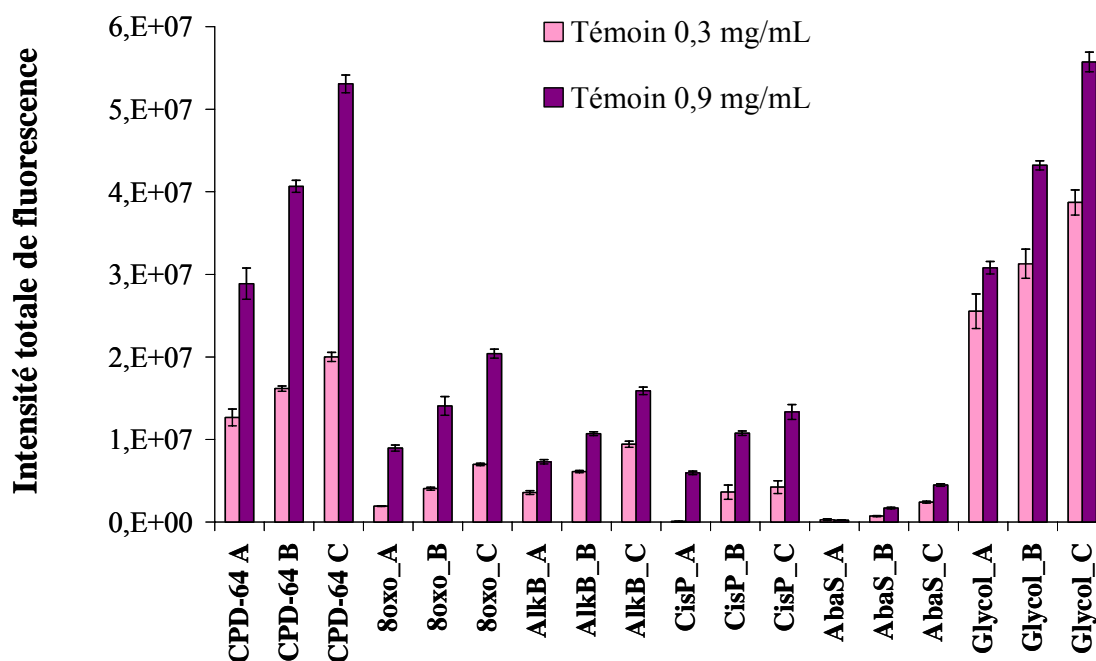


Figure 40: Profil d'ER de lysats nucléaires témoins en présence de deux concentrations protéiques différentes (0,3 et 0,9 mg/mL). Les 3 trois ratios quantité lésions/ quantité d'ADN (A, B et C) sont représentés pour chaque type de lésions.

Le protocole expérimental décrit dans le chapitre IV « Matériels et Méthodes » conduit à l'obtention de lysats nucléaires contenant en moyenne 3 mg/mL de protéines. Nous obtenons alors au final une concentration protéique maximale de 0,6 mg/mL lors de la réaction *in vitro* sur la puce plasmide. Afin de pouvoir travailler à des concentrations supérieures (jusqu'à 1 mg/mL), le protocole a été légèrement modifié. Nous avons diminué par deux le volume permettant la lyse des noyaux, pour la même quantité de cellules. Cette méthode permet d'augmenter la concentration protéique des lysats d'un facteur moyen de 1,5.

ii. Etude de l'effet de la concentration sur les activités d'ER du lysat témoin

La réaction biochimique d'excision-resynthèse a été conduite avec une gamme de concentrations protéiques de 0,3 à 1 mg/mL.

• Effet de la concentration protéique sur le profil de réparation de l'ADN

Une expérience d'ER sur la puce plasmide a été réalisée en présence d'un lysat nucléaire témoin à deux concentrations protéiques différentes (0,3 et 0,9 mg/mL). Le profil d'ER a donc été établi pour ce lysat aux deux concentrations utilisées et ceci après 2 h de réaction (**Figure 40**). Comme cela a déjà été indiqué, les résultats sont présentés après soustraction de l'intensité de fluorescence obtenues pour le plasmide contrôle aux valeurs d'intensité de fluorescence obtenues pour chaque plasmide comportant des lésions.

Comme attendu, l'incorporation de nucléotides fluorescents est plus élevée lorsque la concentration protéique du lysat augmente (0,9 vs 0,3 mg/mL) (Millau *et al.*, 2008b). Cette augmentation de la fluorescence concerne tous les ratios lésions/ADN (A, B et C). Cependant, le fait de multiplier la concentration protéique d'un facteur 3, ne multiplie pas le signal par 3. En effet, la relation entre l'incorporation de nucléotides fluorescents et la quantité de protéines n'est pas linéaire (Millau *et al.*, 2008b). La réaction atteint un plateau et c'est aussi ce que nous observons ici. Cela suggère que certaines protéines seraient limitantes dans le mélange réactionnel.

• Effet de la concentration protéique sur la cinétique d'excision-resynthèse

Nous allons maintenant étudier les cinétiques d'ER obtenues à 1, 2 et 3 h lorsque le lysat est testé aux deux concentrations évoquées ci-dessus (0,3 et 0,9 mg/mL) (**Figure 41**).

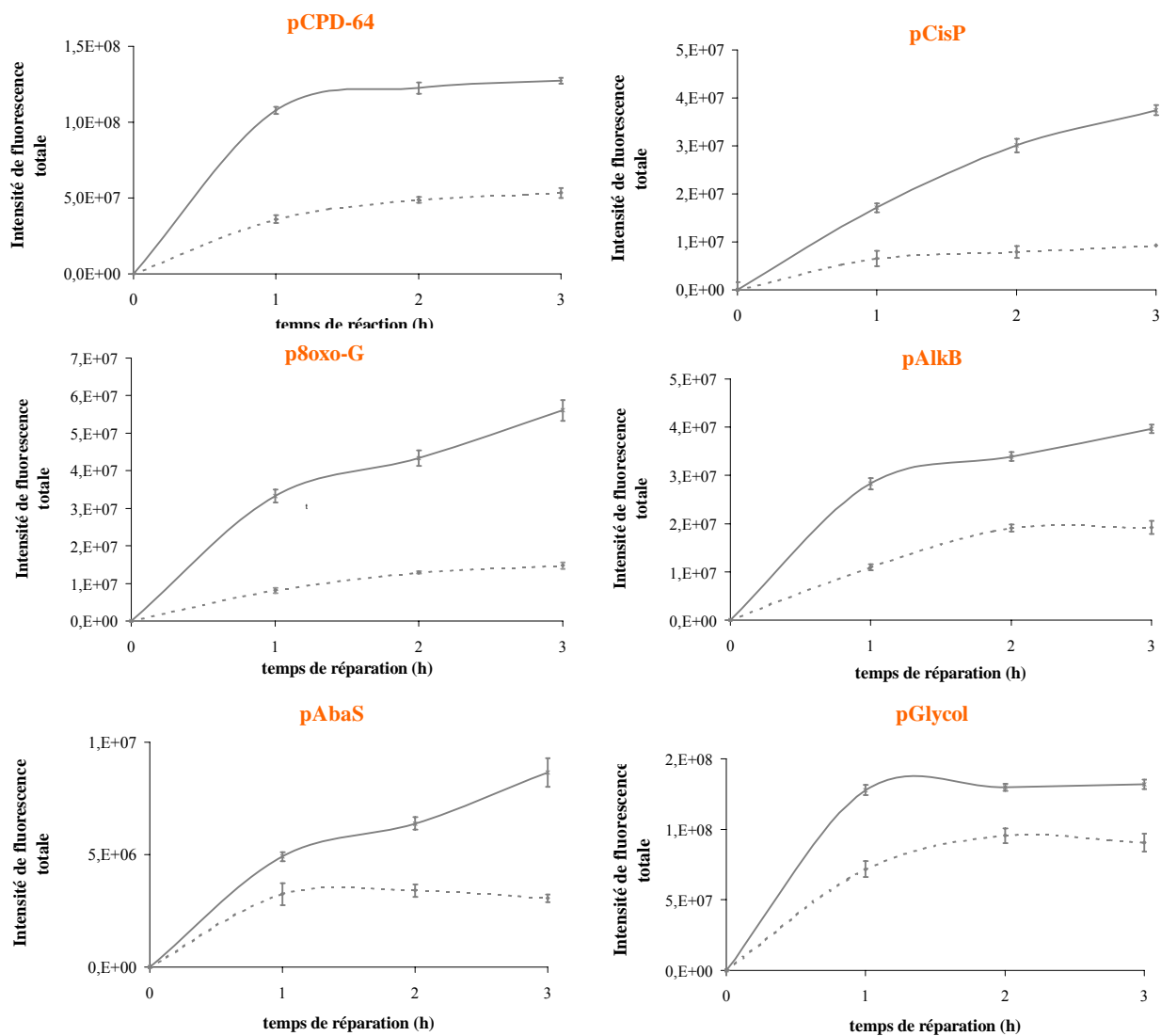


Figure 41: Cinétique d'excision-resynthèse de lysats nucléaires (1 à 3 h). L'intensité de fluorescence obtenue pour le plasmide contrôle a été retranchée à chaque intensité de fluorescence correspondant à un plasmide comportant un type de lésion.

..... 0,3 mg/mL
 — 0,9 mg/mL

L'intensité de fluorescence obtenue pour le plasmide contrôle a été retranchée aux intensités de fluorescence obtenues pour les plasmides comportant des lésions respectivement à 0,3 et 0,9 mg/mL.

Nous pouvons constater que les activités d'ER des différentes lésions considérées ne suivent pas toutes la même cinétique (Figure 41). En effet, alors que la phase plateau est atteinte, comme nous l'avons vu précédemment, pour quasiment toutes les lésions prises en charge par un lysat à 0,3 mg/mL, l'augmentation de la concentration protéique a pour effet de retarder l'apparition de ce plateau pour certaines lésions uniquement.

Ainsi, l'excision-resynthèse des adduits cisplatine suit une cinétique quasiment linéaire lorsque la réaction est mise en œuvre en présence du lysat à la plus forte concentration (0,9 mg/mL) ce qui n'est pas le cas lorsque la réaction est réalisée à la plus faible concentration (0,3 mg/mL). La vitesse initiale de la réaction d'ER augmente d'un facteur 2,5 lorsque la concentration est multipliée par 3. De plus, le plateau n'est pas atteint au bout de 3 h de réaction alors qu'il apparaît très rapidement en présence de 0,3 mg/mL (fléchissement de la courbe dès 1 h). Ainsi, lorsque la concentration protéique augmente, la cinétique de réaction change ce qui laisse penser que des mécanismes différents interviennent à 0,9 mg/mL par rapport à 0,3 mg/mL. Nous pouvons penser que certaines protéines qui étaient en quantité limitante à 0,3 mg/ml sont présentes en quantité suffisante pour intervenir dans la réaction et en modifier les paramètres cinétiques à 0,9 mg/mL.

Lorsque la réaction est menée à 0,9 mg/mL, la réparation des lésions 8-oxoG, des sites abasiques et des bases alkylées suit une cinétique différente de celle observée pour les adduits cisplatine. En effet, la vitesse de la réaction ralentit entre 1 et 2 h puis la vitesse augmente à nouveau, signature éventuelle d'un recrutement d'enzymes de réparation ou de co-facteurs en deux étapes (réaction biphasique). Il est à noter que lorsque la concentration protéique est multipliée par 3, c'est la vitesse initiale d'ER de la 8-oxoG qui est la plus fortement augmentée. Celle-ci augmente d'un facteur 4,2.

L'augmentation d'un facteur 3 de la concentration en protéines modifie la vitesse initiale de réparation des photoproduits par 3 et celle des diols de pyrimidine par 1,8. Il est à noter que la phase plateau est atteinte dès 1 h de réaction avec un lysat à 0,9 mg/mL alors qu'elle arrive après 2 h de réaction lorsque la réaction est conduite avec 0,3 mg/mL. Dans ce cas, il se peut que la quantité de substrat présent sur le support soit limitante.

En conclusion, les paramètres des cinétiques de réaction (allure des courbes, vitesses initiales, apparition de plateau) diffèrent aux 2 concentrations en protéines testées et sont spécifiques à

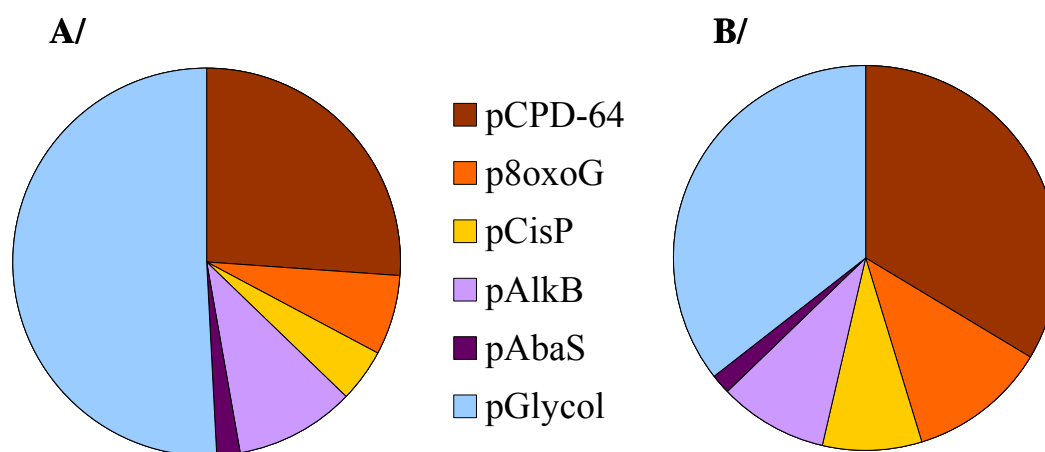


Figure 42: Répartition de la réparation des différentes lésions prise en charge par un lysat nucléaire témoin à deux concentrations protéiques différentes : **A/** 0,3 mg/mL, **B/** 0,9 mg/mL. Pour chaque type de lésions, les intensités de fluorescence obtenues pour les 3 trois ratios quantité lésions/ quantité d'ADN (A, B et C) ont été sommées.

chaque type de lésion. Ainsi, les mécanismes mis en jeu pourraient être différents à 0,3 et 0,9 mg/ml et/ou le rôle régulateur de certaines protéines limitantes lorsque la concentration est de 0,3 mg/ml pourrait être révélé à la concentration supérieure.

Nous allons maintenant nous intéresser à l'impact de la concentration en protéines sur la répartition de la réparation des différentes lésions.

- Effet de la concentration protéique sur la répartition de la réparation des différentes lésions

La proportion relative de la réparation des différentes lésions apporte également de nouvelles informations quant à l'effet de la concentration en protéines sur les activités d'excision-resynthèse du lysat témoin (**Figure 42**). En effet, la répartition est différente entre les lésions en présence de 0,3 ou 0,9 mg/mL de protéines. Lorsque la réaction est réalisée avec 0,9 mg/mL, la part relative d'excision-resynthèse des photoproduits, de la 8-oxoG et des adduits cisplatine est plus forte qu'à faible concentration.

Ainsi, la part relative des lésions spécifiques de la NER (photoproduits et adduits cisplatine) augmente lorsque la réaction sur la puce est conduite à la plus forte concentration. De façon intéressante, les activités enzymatiques spécifiques de la NER sont relativement plus efficaces lorsque la réaction utilise plus de protéines nucléaires. A faible concentration (0,3 mg/mL), les protéines de la NER seraient en concentration limitante et les activités BER ou des voies alternatives de réparation seraient prédominantes.

La répartition de l'ER des différentes lésions est à relier aux cinétiques de réparation décrites précédemment. En effet, nous avons vu qu'à la plus forte concentration, la réaction d'ER suit une augmentation quasiment linéaire en fonction du temps pour les lésions 8-oxoG et cisplatine. Les résultats suggèrent donc qu'il faille une forte concentration protéique pour que la réparation de ces deux lésions soit efficace, ce qui peut rejoindre le fait qu'il faille plus de temps pour réparer ces lésions.

Plusieurs paramètres peuvent influencer sur le phénotype de réparation de l'ADN obtenu avec le test, notamment comme attendu, la durée de la réaction et la concentration protéique. Nous avons, ainsi, constaté qu'il est important de faire varier les conditions de réaction pour ne pas passer à côté d'informations essentielles. Généralement, les résultats montrés avec le test de référence sont obtenus en associant une concentration protéique à une quantité de substrat donnée et ce pour un temps de réaction donné. Cette approche statique ne permet pas de rendre compte des paramètres enzymatiques qui caractérisent cependant toute réaction

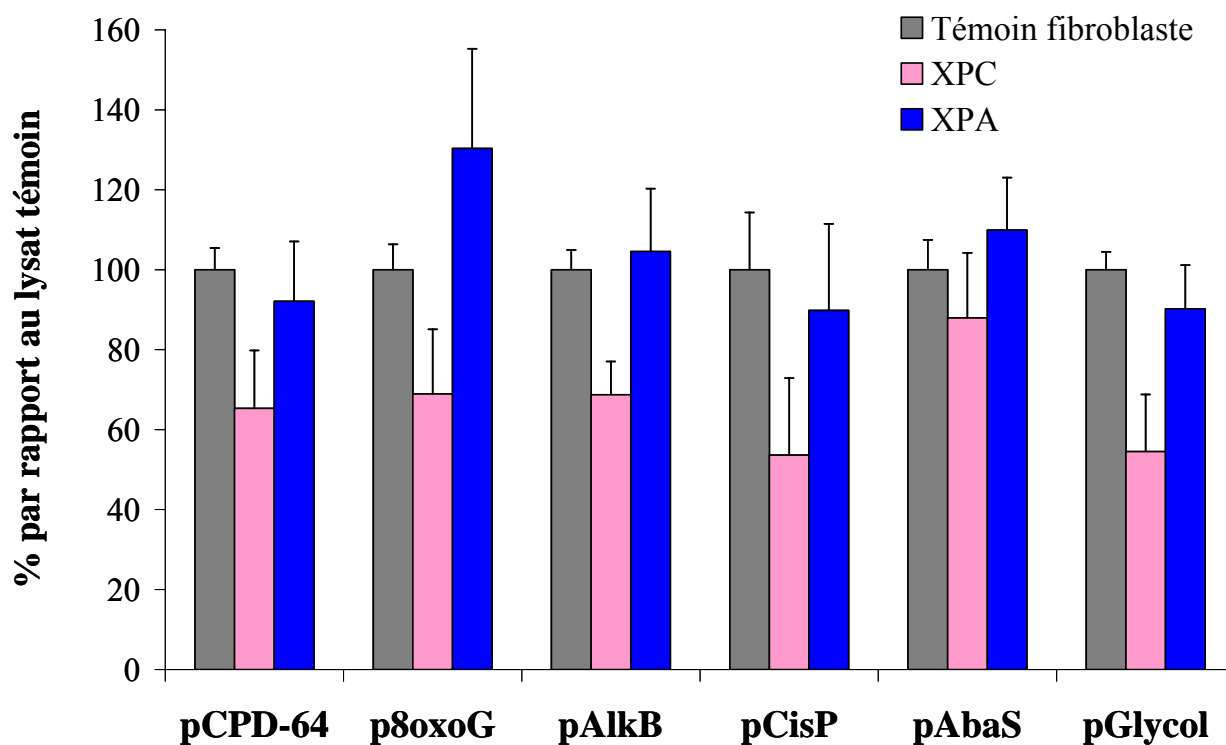


Figure 43: Niveau relatif d'excision-resynthèse de lysats nucléaires de fibroblastes déposés à 0,3 mg/mL de protéines (moyenne de 5 expériences indépendantes). Pour chaque lysat XP, l'intensité totale de fluorescence est exprimée en pourcentage de l'intensité de fluorescence du lysat témoin. L'intensité de fluorescence du lysat témoin est fixée à 100%.

associant enzymes et substrats. Notre approche dynamique, par rapport au test de référence, permet donc d'aborder des questions mécanistiques et d'appréhender la complexité des voies de réparation.

Notre test *in vitro* se différencie du test de référence, entre autre, par la présence de plusieurs substrats au sein de la même réaction. Ainsi, il s'agit de trouver une gamme de concentrations protéique pour laquelle nous avons une réponse satisfaisante pour tous les substrats. Nous avons testé une gamme de concentrations protéique entre 0,3 et 1 mg/mL. Nous allons maintenant comparer les activités d'excision-resynthèse du lysat témoin avec celles des lysats XP en travaillant avec cette gamme de concentrations.

2. Caractérisation de phénotypes de réparation XPA et XPC

a) Réaction d'excision-resynthèse en présence de 0,3 mg/mL de protéines nucléaires

La réaction d'excision-resynthèse a été conduite en présence de 0,3 mg/mL de protéines pendant 2 h à 30 °C. Les protéines nucléaires ont été obtenues après la lyse de fibroblastes témoins ou de fibroblastes de cellules déficientes pour la réparation (XPA et XPC).

Nous avons réalisé cinq expériences indépendantes. Pour chaque expérience, nous avons exprimé l'intensité de fluorescence obtenue pour un lysat XP suivant un pourcentage par rapport au lysat de référence à savoir le lysat de cellules normales. Le niveau d'excision-resynthèse du lysat témoin est fixé à 100 %. Les cinq pourcentages ainsi calculés ont ensuite été moyennés afin d'obtenir un profil relatif (*ie.* par rapport au lysat témoin) pour chaque lysat nucléaire XP (A et C) (**Figure 43**).

Le niveau d'ER du lysat de fibroblastes XPC^{-/-} est inférieur au niveau d'ER obtenu avec le lysat témoin (Figure 43). L'activité de réparation est plus faible dans le lysat XPC par rapport au témoin et ceci s'observe pour toutes les lésions présentes sur la puce hormis les sites abasiques pour lesquels la différence n'est pas significative. Alors qu'avec le modèle siRNA, seules les petites lésions étaient concernées par la diminution d'activité d'ER du lysat XPC, cette fois-ci les lésions « volumineuses » (*ie.* photoproduits et adduits cisplatine) sont concernées par la diminution du niveau de réparation. Le lysat XPC a une activité d'excision-resynthèse d'environ 67 % par rapport à celle du lysat témoin. Le tableau ci-après

(**Tableau 8**) récapitule les différents niveaux d'activités de réparation obtenus pour les deux lysats XP et pour toutes les lésions présentes sur la puce.

	voie NER		NER/BER	voie BER		
	pCPD-64	pCisP	pAlkB	p8oxoG	pAbaS	pGlycol
Témoin Fibroblaste	100 (+/- 5)	100 (+/- 14)	100 (+/- 5)	100 (+/- 6)	100 (+/- 7)	100 (+/- 4)
XPA	92 (+/- 15)	90 (+/- 22)	105 (+/- 16)	130 (+/- 25)	110 (+/- 13)	90 (+/- 11)
XPC	65 (+/- 14)	54 (+/- 19)	69 (+/- 8)	69 (+/- 16)	88 (+/- 16)	54 (+/- 14)

Tableau 8 : Niveaux d'excision-resynthèse obtenus pour les lysats nucléaires de fibroblastes XPA et XPC exprimés par rapport au lysat témoin (réaction en présence de 0,3 mg/mL)

Comme pour le modèle siRNA, le profil relatif d'excision-resynthèse du lysat XPA est différent de celui obtenu pour XPC puisqu'il n'y a pas de différence entre les activités du lysat témoin et du lysat XPA pour les photoproduits, les bases alkylées, les adduits cisplatine les sites abasiques et les diols de pyrimidine. Le lysat nucléaire XPA répare ces lésions autant que le lysat témoin. Le résultat obtenu pour la lésion 8-oxoG est surprenant puisque dans ce cas-ci, l'excision-resynthèse du lysat XPA est supérieure à ce qui est obtenu avec le lysat témoin. Ainsi, la concentration protéique de 0,3 mg/mL ne permet pas de mettre en valeur une déficience particulière au niveau de la réparation pour le lysat XPA, au contraire pour la lésion 8-oxoG, la réparation est même plus efficace dans ce lysat.

En conclusion, les profils relatifs obtenus au niveau basal pour les deux modèles cellulaires (fibroblastes et HeLa siRNA) en utilisant entre 0,3 et 0,4 mg/mL de protéines sont concordants pour le phénotype XPA. En effet, dans les deux modèles, il n'y a pas de différence d'activité d'ER entre un lysat témoin et un lysat XPA. Pour le lysat XPC, les deux modèles cellulaires concordent en ce qui concerne l'ER des lésions prises en charge par la voie BER. En effet, la réparation de ces lésions est plus faible dans un lysat nucléaire XPC par rapport à un lysat témoin. Cependant, les deux modèles cellulaires donnent des niveaux relatifs d'ER différents en ce qui concerne les lésions spécifiques de la NER (photoproduits et adduits cisplatine).

Ces résultats avec les lysats nucléaires XP sont surprenants, nous nous attendions à avoir des niveaux de réparation très faibles pour les deux phénotypes XP (A et C). En effet, les niveaux obtenus par exemple avec le test UDS ne dépassent pas 20 % du témoin. Ainsi, les niveaux

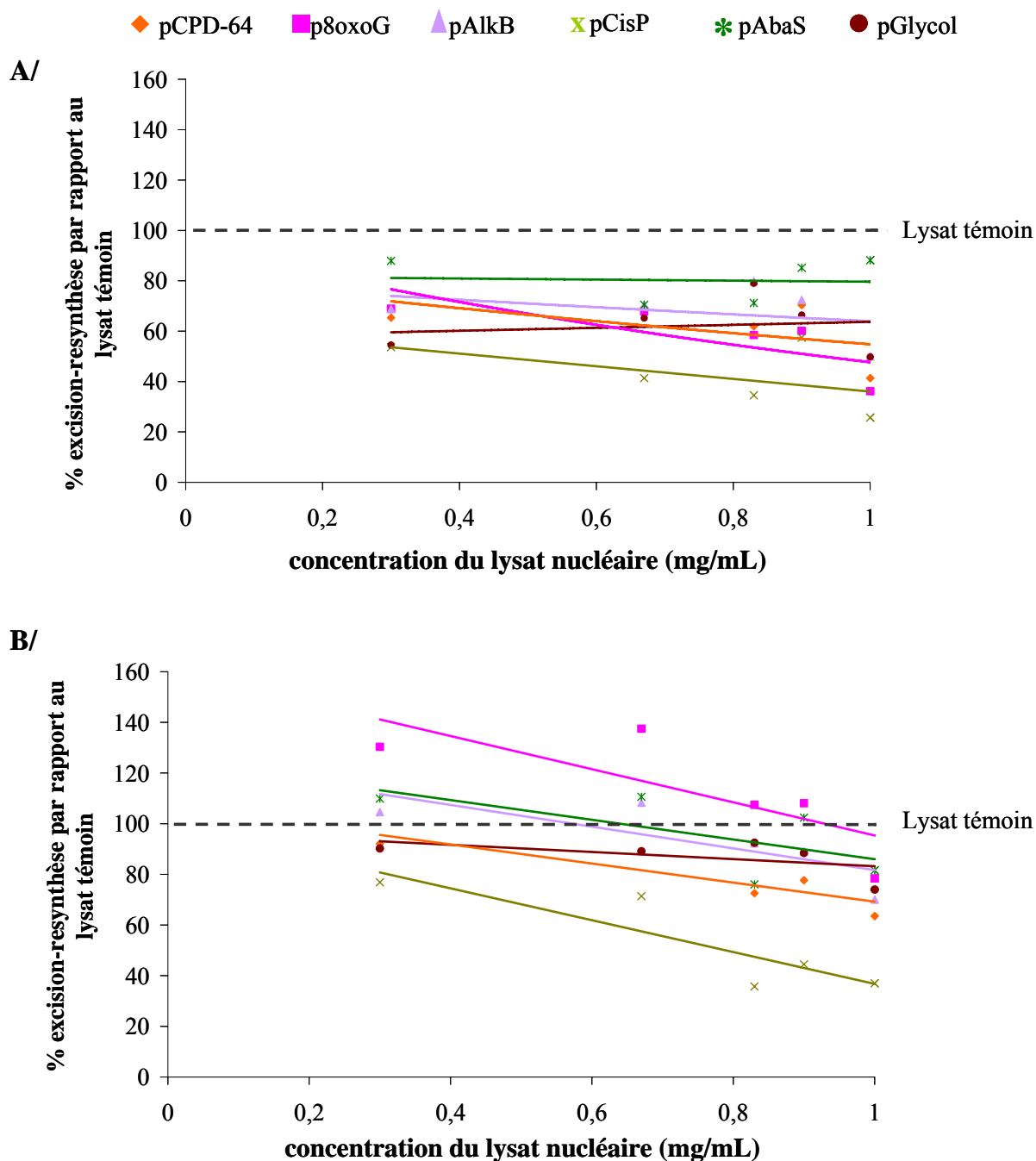


Figure 44: Niveaux relatifs d'excision-resynthèse de lysats nucléaires déposés à différentes concentrations (de 0,3 à 1 mg/mL). Pour chaque lysat XP, l'intensité totale de fluorescence est exprimée en pourcentage de l'intensité de fluorescence du lysat témoin. L'intensité de fluorescence du lysat témoin est fixée à 100%. **A/** Résultats pour le lysat XPC. **B/** Résultats pour le lysat XPA.

obtenus grâce à notre test multiplexé sont plus élevés et nous obtenons même un niveau d'activité équivalent au témoin pour le lysat XPA.

Au début du projet, nous avons délibérément choisi d'étudier la réaction d'ER sur support avec des concentrations protéiques de l'ordre de 0,3 mg/mL pour se placer dans des conditions réactionnelles limitantes et réalistes. L'objectif était d'arriver à baisser encore la concentration protéique en dessous de 0,3 mg/mL pour être capable de travailler à partir de peu de cellules (50 000-100 000). Aux vues de nos résultats obtenus avec les lysats XP, nous nous sommes donc interrogés sur nos conditions expérimentales. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'il faille au contraire augmenter la concentration protéique pour pouvoir discriminer les phénotypes de réparation.

Nous allons donc maintenant étudier les différents phénotypes de réparation pour les trois lysats (témoin, XPA et XPC) en menant les réactions d'ER sur une gamme de concentrations allant de 0,3 à 1 mg/mL.

b) Réaction d'excision-resynthèse avec une gamme de concentration de 0,3 à 1 mg/mL de protéines

Plusieurs expériences de réparation sur support ont été conduites avec des lysats nucléaires XP et témoin en présence à chaque fois de la concentration 0,3 mg/mL et d'une concentration plus forte (0,7 ; 0,8 ; 0,9 ou 1 mg/mL). Pour chaque expérience, il a pu être établi le profil relatif (*ie.* par rapport au lysat témoin) pour les deux lysats XP à la faible concentration protéique (0,3 mg/mL) et à une plus forte concentration. La **figure 44** présente le niveau relatif obtenu pour le lysat XPC (A/) et pour le lysat XPA (B/) par rapport au lysat témoin dont le niveau est fixé à 100 % (trait en pointillé), pour toutes les lésions présentes sur la puce et pour toutes les concentrations protéiques testées. Ainsi, les résultats obtenus pour la réaction réalisée en présence de 0,3 mg/mL correspondent aux valeurs précédemment décrites dans la figure 43 et le tableau 9.

La **figure 44 A/** présente le profil relatif obtenu avec le lysat de cellules XPC^{-/-} à différentes concentrations croissantes de protéines. Lorsque la réaction est conduite en présence de 0,3 mg/mL de protéines, le niveau d'ER du lysat XPC est bien inférieur à celui du témoin, comme nous l'avons précédemment décrit, et ceci pour toutes les lésions sauf les sites abasiques. Lorsque la concentration en protéine augmente, l'intensité de fluorescence totale

augmente quelle que soit la lésion considérée et quel que soit le ratio lésion/ADN (données non montrées). Cependant, le niveau relatif d'ER (*ie.* par rapport au lysat témoin) reste quasiment le même, quelle que soit la concentration protéique pour les sites abasiques, les bases alkylées et les diols de pyrimidine. En effet, le niveau relatif obtenu pour les sites abasiques reste aux alentours de 80-90 %, celui obtenu pour les diols de pyrimidines fluctue entre 50 et 60 % quelle que soit la concentration. Ainsi, la concentration en protéine n'a pas d'effet sur le profil relatif de XPC^{-/-} pour ces trois types de lésions. En revanche, nous observons une diminution de l'activité relative d'ER pour les lésions 8-oxoG, les photoproduits et les adduits cisplatine. Nous avons vu précédemment, que la part relative de réparation augmente pour ces trois lésions, lorsque la concentration protéique est supérieure à 0,3 mg/mL. Les photoproduits et les adduits cisplatine étant réparés par la voie NER, il est logique que l'effet de la déficience pour la protéine XPC soit exacerbé lorsque la voie NER semble plus active. Nous avons montré précédemment, le rôle de XPC dans la réparation des lésions prises en charge par la BER, donc il est également logique d'observer un effet plus marqué de la déficience de cette protéine à forte concentration protéique. Pour les autres « petites » lésions (sites abasiques, diols de pyrimidine), le niveau relatif reste le même quelle que soit la concentration protéique du lysat XPC. Cela suggère que la régulation de la réparation de ces deux lésions est différente de celle engagée pour la 8-oxoG.

Nous allons maintenant analyser l'effet de la concentration protéique sur le profil relatif du lysat XPA. Comme nous l'avons vu précédemment, lorsque la réaction est conduite en présence de 0,3 mg/mL, le niveau d'ER du lysat XPA est similaire à celui du lysat témoin. Pour certaines lésions, comme la 8-oxoG, l'activité est même supérieure. A l'inverse, nous observons une différence d'activité d'ER entre le lysat XPA et le lysat témoin lorsque la concentration en protéines augmente. En effet, le profil relatif d'ER du lysat de cellules XPA varie en fonction de la concentration en protéine (**Figure 44 B/**). On observe une très nette diminution du niveau relatif de réparation de XPA à partir de 0,7 mg/ml et ce pour toutes les lésions, sauf les diols de pyrimidine. Ainsi, contrairement à ce qui est obtenu avec XPC, la diminution concerne aussi les bases alkylées et les sites abasiques. Par contre, comme pour le lysat XPC, le niveau relatif d'ER obtenu pour les diols de pyrimidines est indépendant de la concentration protéique. L'effet relatif de la concentration en protéines dans le milieu réactionnel est plus fortement marqué pour les extraits XPA que pour les extraits XPC et a un impact majeur notamment sur la réparation relative de certaines lésions réparées par la NER comme nous le détaillons ci-après.

	voie NER		NER/BER	voie BER		
	pCPD-64	pCisP	pAlkB	p8oxoG	pAbaS	pGlycol
Témoin Fibroblaste	100 (+/- 4)	100 (+/- 6)	100 (+/- 8)	100 (+/- 7)	100 (+/- 9)	100 (+/- 4)
XPA	64 (+/- 4)	37 (+/- 2)	70 (+/- 4)	78 (+/- 6)	73 (+/- 1)	74 (+/- 4)
XPC	41 (+/- 5)	26 (+/- 6)	50 (+/- 6)	36 (+/- 6)	88 (+/- 14)	50 (+/- 5)

Tableau 9 : Niveaux d’excision-resynthèse obtenus pour les lysats nucléaires de fibroblastes XPA et XPC exprimés par rapport au lysat (réaction en présence de 1 mg/mL de protéines)

Le tableau ci-dessus (**Tableau 9**) récapitule les niveaux d’ER obtenus lors de la réaction en présence de 1 mg/mL de protéines. Les pourcentages obtenus, ici, sont à comparer avec ceux obtenus à 0,3 mg/mL (Tableau 9). Alors que le niveau global d’ER lors de notre test était d’environ 100 % avec un lysat XPA à 0,3 mg/mL, le niveau chute à environ 65 % lorsque le lysat XPA est utilisé à la concentration de 1 mg/mL. Il est intéressant de noter qu’à la concentration de 1 mg/mL, les niveaux les plus faibles sont obtenus pour les lésions prises en charge par la NER et pour la 8-oxoG ce qui est à mettre en relation avec la répartition de la réparation de ces lésions à forte concentration (Figure 42).

Pour les adduits cisplatine, le pourcentage d’ER du lysat XPA (37 %) se rapproche de ce qui est obtenu dans la littérature. En effet, 22 h après un traitement des cellules au cisplatine, les cellules XPA ont réparé environ 50 % des adduits par rapport au témoin (Dijt *et al.*, 1988). Dans une autre étude, il est montré que les cellules XPA réparent les pontages intra et inter-brin générés par le cisplatine avec une efficacité d’environ 35 % par rapport au témoin (Zhen *et al.*, 1993). Pour le lysat XPC, la diminution est plus atténuée que pour un lysat XPA. En effet, alors que le niveau global de réparation chute de 35 % pour le lysat XPA, le niveau chute de 18 % pour le lysat XPC.

Pour la réparation des photoproduits, l’effet de la concentration protéique du lysat XPA est moins important pour cette lésion que pour les adduits cisplatine. En effet, le niveau relatif obtenu à 1 mg/mL de protéines avec le lysat XPA est d’environ 65 %. Ce niveau est inférieur au niveau obtenu à faible concentration, mais il reste encore supérieur aux niveaux de réparation décrits dans la littérature (*ie.* environ 10 % avec la méthode de référence) (Masutani *et al.*, 1993). Ainsi, l’effet de la concentration protéique sur la réaction d’ER est différent suivant les lésions présentes sur le support. Ce résultat souligne l’existence de mécanismes enzymatiques différents pour la réparation des photoproduits et des adduits cisplatine, lésions prises en charge pourtant par la même voie de réparation, la NER. Nous

pouvons penser que la réparation des photoproduits et des adduits cisplatine fait appel à des facteurs différents et/ou à des régulations différentes. Une explication pourrait être la réparation très rapide des photoproduits 6-4 contenus dans le mélange de photoproduits présents sur la puce (CPDs et 6-4 PPs). En effet, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre I, ces deux types de photoproduits ne sont pas réparés avec le même rendement : la réparation des CPDs est beaucoup plus lente que celle des 6-4 PPs. Ainsi, dans notre cas, l'ER que nous observons au niveau du plasmide pCPD-64 pourrait être attribuée majoritairement ou entièrement à la réparation des 6-4 PPs et non à celle des CPDs. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi le niveau relatif de réparation de cette lésion par le lysat XPA est encore relativement élevé, même à forte concentration protéique.

En conclusion, alors que les phénotypes de réparation sont similaires à 0,3 mg/mL, il devient possible de discriminer les activités d'excision-resynthèse correspondant au phénotype XPA et au phénotype témoin, lorsque la réaction est conduite avec une concentration supérieure à 0,3 mg/mL.

Notre démarche initiale a été de se placer à faible concentration protéique (0,3 mg/mL) afin d'étudier la réaction d'ER lorsque les enzymes de la réparation sont présentes en quantité limitante par rapport au substrat, ce que nous trouvons plus pertinent. En effet, l'équation de Michaelis et Menten se vérifie uniquement lorsque la concentration de substrat est supérieure à celle de l'enzyme. Les expériences, présentées par la suite, pour l'étude de la réponse suite à un traitement génotoxique, ont donc été réalisées avec 0,3 mg/mL. Cependant, les résultats de l'effet de la concentration sur les activités d'ER des différents lysats, obtenus tardivement dans le déroulement du projet, soulèvent certaines questions qui seraient intéressantes d'approfondir lors d'analyses ultérieures.

3. Profils de réparation obtenus à partir de cellules $XPC^{-/-}$, $XPD^{-/-}$ et $XPG^{-/-}$

Nous avons également établi le profil de réparation pour d'autres lignées cellulaires (également transformées par SV40). Les résultats ont été obtenus à partir de deux expériences indépendantes en présence de 0,2 mg/mL pendant 2 h. En effet, les lysats n'étaient pas assez concentrés pour travailler à 0,3 mg/mL. Les profils relatifs (*ie.* par rapport au lysat témoin) de réparation de l'ADN sont présentés pour des lysats nucléaires de cellules $XPC^{-/-}$ (GM16093), $XPD^{-/-}$ (GM08207) et $XPG^{-/-}$ (GM14930) (**Figure 45**). La lésion pCisP n'est pas représentée en raison du faible niveau de fluorescence totale obtenu.

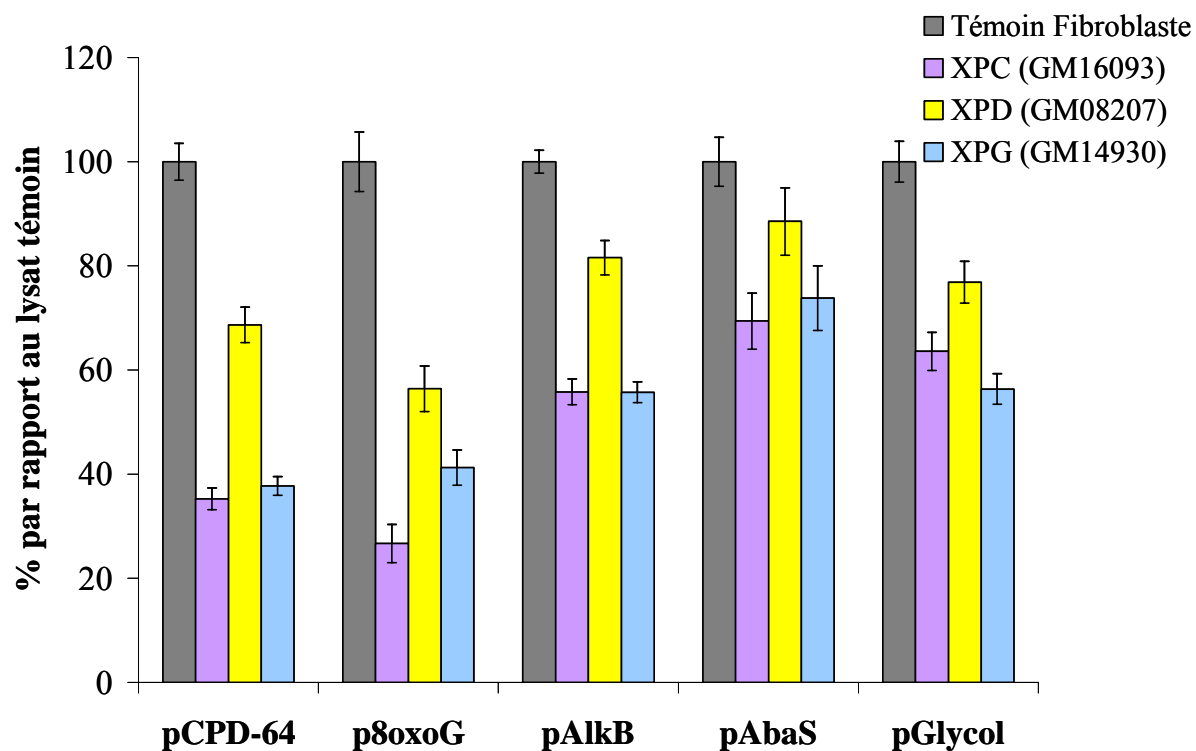


Figure 45: Niveaux relatif d'excision-resynthèse de lysats nucléaires de fibroblastes déposés à 0,2 mg/mL de protéines (moyenne de 2 expériences réalisées de façon indépendante). Pour chaque lysat XP, l'intensité totale de fluorescence est exprimée en pourcentage de l'intensité de fluorescence du lysat témoin. L'intensité de fluorescence du lysat témoin est fixée à 100%.

Le lysat XPC de cellules GM16093 présente un profil, globalement équivalent, à celui obtenu à partir de la souche AS1WT à savoir un niveau d'activité d'ER inférieur au lysat témoin pour toutes les lésions présentes sur la puce, aussi bien les lésions prises en charge par la BER que les lésions prises en charge par la NER. Cependant, le niveau est plus faible avec le lysat de cellules GM16093 (50%) que pour le lysat de cellules AS1WT (67 %). Ainsi, grâce à notre mesure, nous sommes capables d'observer des variabilités inter-individuelles. Par ailleurs, il est à noter le niveau particulièrement faible obtenu pour la 8-oxoG (27 %) ce qui confirme bien l'implication de la protéine XPC dans la réparation de cette lésion.

Le lysat XPD présente un niveau d'ER supérieur à aux lysats XPC. Le niveau de réparation des photoproduits est cependant inférieur à celui obtenu pour le lysat témoin. Le niveau global de réparation de l'ensemble des lésions est d'environ 75 %. Il a été montré une grande hétérogénéité au sein du groupe de complémentation D pour la réparation des dommages. Le niveau UDS varie entre 20 et 45 % (Lehmann 2001). Ainsi, le niveau que nous obtenons, ici, reste cohérent par rapport aux résultats de la littérature. De plus, la 8-oxoG est là encore faiblement réparée par rapport aux autres lésions, suggérant ainsi l'implication de la protéine XPD dans la réparation de cette lésion prise en charge principalement en théorie par la voie BER.

Le lysat XPG, quant à lui, présente globalement le même profil de réparation de l'ADN que le lysat XPC (GM16093). En effet, nous observons un niveau de réparation plus faible pour les photoproduits et la 8-oxoG (environ 40 % du niveau du témoin) et un niveau de réparation un peu plus élevé (> 60 %) pour les bases alkylées, les sites abasiques et les diols de pyrimidine.

4. Caractérisation de phénotypes de réparation XP avec des extraits totaux

Les résultats présentés jusqu'ici ont été obtenus à partir de lysats nucléaires. Cependant, le test de référence est généralement réalisé à partir de lysats totaux. Nous avons donc voulu comparer les activités obtenues avec notre test à partir de lysats totaux avec les niveaux d'activités de la littérature.

La concentration protéique des lysats obtenus par lyse totale des fibroblastes est plus élevée que celle que nous obtenons en lysant uniquement les noyaux (de 8 à 10 mg/mL pour un lysat total contre 3 mg/mL pour un lysat nucléaire). La réaction sur la puce avec un lysat total met en jeu une quantité plus grande de protéine. Si nous partons du postulat que la

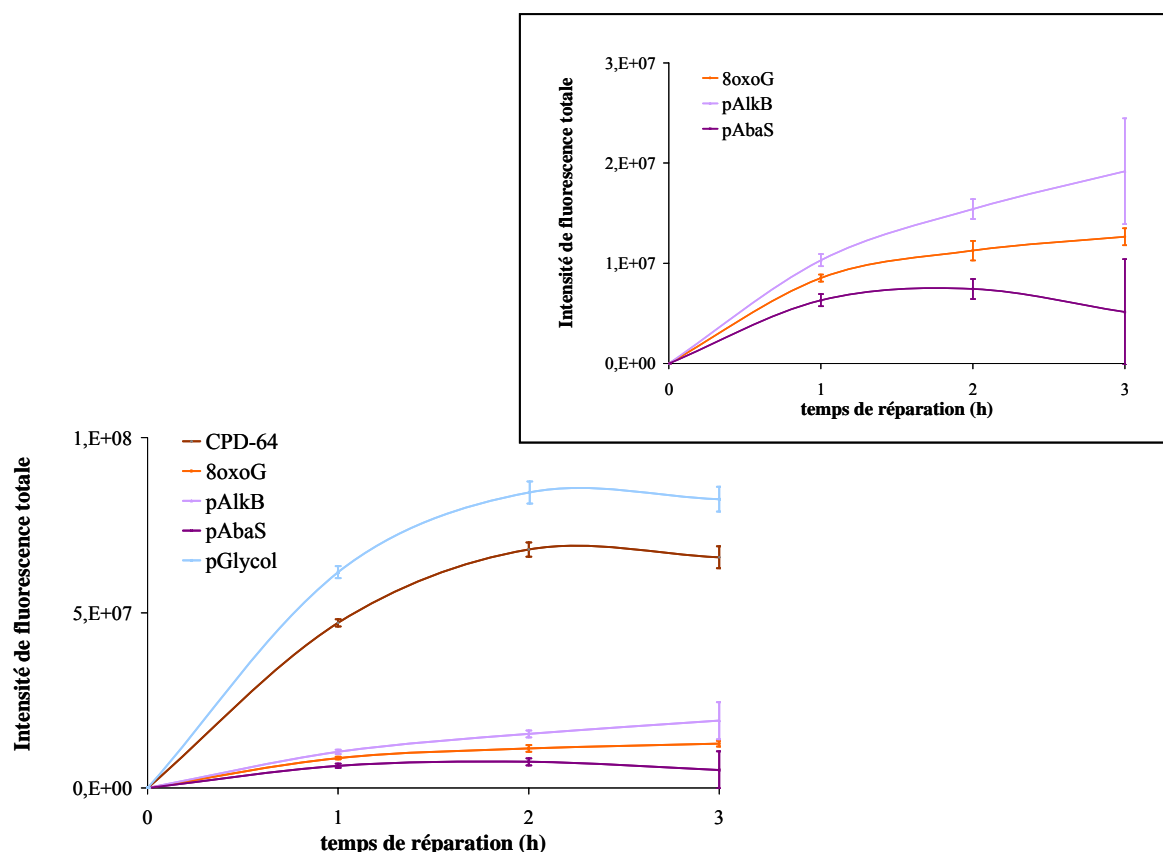


Figure 46: Cinétique d'excision-resynthèse (1 à 3 h) obtenue avec 1,6 mg/mL de lysat total de fibroblastes témoin. Les deux graphes montrent les résultats obtenus pour la même réaction mais ils sont représentés selon deux échelles différentes d'intensité de fluorescence. Ainsi, le graphe dans l'encadré montre uniquement les lésions pour lesquelles le signal fluorescent est plus faible.

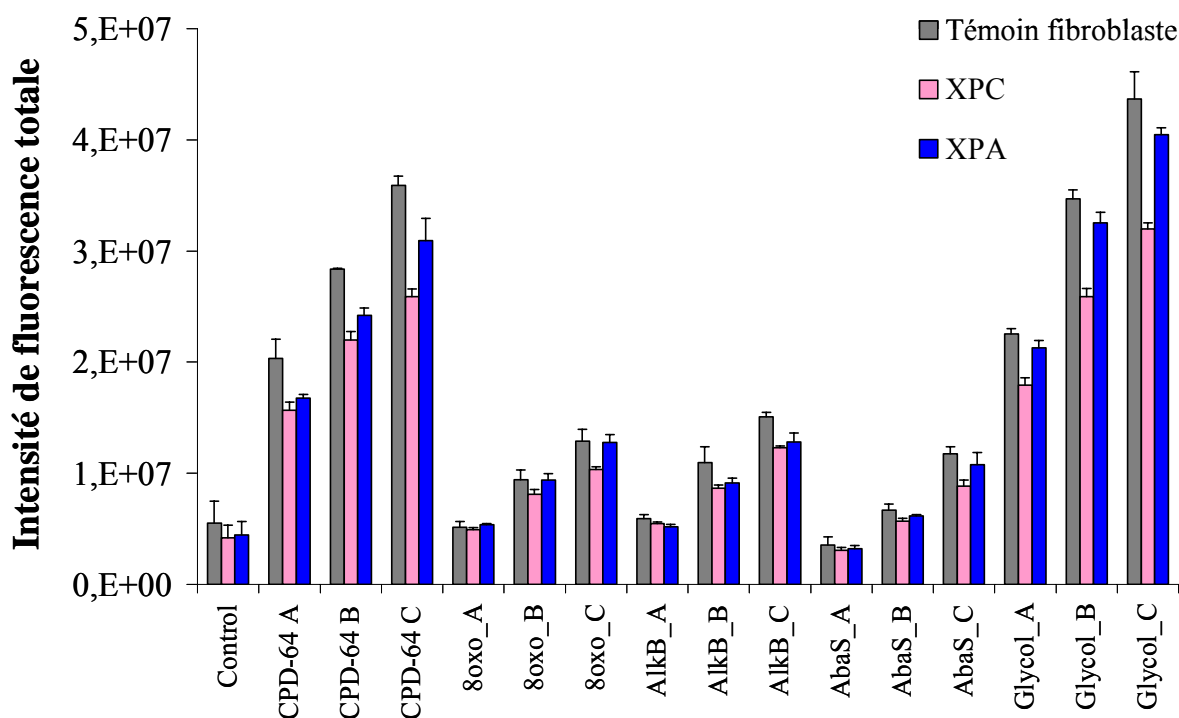


Figure 47: Profil d'excision-resynthèse de lysats totaux en présence de 1,6 mg/mL de protéines. Les 3 trois ratios quantité lésions/ quantité d'ADN (A, B et C) sont représentés pour chaque type de lésions.

majorité des protéines de la réparation sont situées dans le noyau, elles seront donc plus diluées dans un lysat total par rapport à un lysat nucléaire. C'est pourquoi la réaction sur la puce est réalisée avec une plus forte concentration protéique lorsqu'elle est conduite à partir de lysats totaux. Dans l'expérience présentée ci-dessous la concentration protéique lors de la réaction d'ER est de 1,6 mg/mL.

L'étude de la cinétique d'ER du lysat total de fibroblastes témoin (**Figure 46**) montre que la vitesse de la réaction ralentit dès 1 h de réaction pour atteindre un plateau entre 2 et 3 h pour toutes les lésions. La phase plateau est plus marquée et plus précoce que ce que l'on obtient avec des lysats nucléaires. Pour certaines lésions comme les diols de pyrimidine et les sites abasiques, l'intensité de fluorescence est inférieure à 3 h par rapport à celle obtenue après 2 h de réaction ce qui rejoint les conclusions de J.F Millau après l'utilisation d'extrait totaux de cellules HeLa à 2 mg/mL.

Pour comparer les différents lysats entre eux (XP vs témoin), il est donc préférable de regarder l'ER après 2 h de réaction. La **figure 47** présente le profil de réparation des différents lysats totaux c'est-à-dire l'intensité de fluorescence totale obtenue pour chaque plasmide présent sur la puce. La lésion pCisP n'est pas représentée car le niveau de fluorescence totale était trop faible. Nous observons que l'intensité de fluorescence totale croît lorsque le ratio lésions/ADN (A, B et C) augmente.

Les intensités de fluorescence totale des deux lysats XP ne diffèrent guère de celles obtenues pour le lysat témoin et ceci pour toutes les lésions, aussi bien celles prises en charge par la NER que celles prises en charge par la BER. Le tableau ci-dessous récapitule les niveaux relatifs (*ie.* par rapport au lysat témoin) des deux lysats XP (**Tableau 10**).

	voie NER	NER/BER	voie BER		
	pCPD-64	pAlkB	p8oxoG	pAbaS	pGlycol
Témoin fibroblaste	100 (+/- 3)	100 (+/- 6)	100 (+/- 9)	100 (+/- 6)	100 (+/- 4)
XPA	86 (+/- 4)	89 (+/- 5)	126 (+/- 7)	108 (+/- 9)	96 (+/- 2)
XPC	75 (+/- 3)	90 (+/- 2)	95 (+/- 4)	83 (+/- 5)	75 (+/- 2)

Tableau 10 : Niveaux d'excision-resynthèse obtenus pour les lysats totaux de fibroblastes XPA et XPC exprimés par rapport au lysat

A la différence de ce qui est obtenu avec des lysats nucléaires (CF tableau 8), le niveau relatif du lysat total XPC est quasiment identique au lysat témoin sauf pour les photoproduits. Le niveau de réparation global obtenu avec notre test est d'environ 85 % comparé aux 67 % obtenus avec un lysat nucléaire. Pour les photoproduits, le niveau est inférieur à celui du témoin, comme pour le lysat nucléaire. Ainsi, un lysat nucléaire et un lysat total XPC sont tous les deux déficients pour la réparation des photoproduits, lésions emblématiques de la voie NER. Ce résultat confirme le rôle très important joué par cette protéine dans la voie de réparation. La réparation des lésions oxydatives n'est visiblement pas diminuée dans un lysat total XPC (8-oxoG et sites abasiques) alors que la réparation des lésions prises en charge par la BER est plus faible dans un lysat nucléaire XPC par rapport au lysat témoin. La notion de compartiment cellulaire est donc ici évoquée ; nous obtenons des phénotypes de réparation différents suivant le compartiment d'où ont été extraites les protéines. Ainsi, le niveau de réparation obtenu avec un lysat nucléaire est plus discriminant vis à vis du phénotype XPC. De plus nous obtenons des informations concernant l'implication de la protéine XPC dans la voie BER avec un lysat nucléaire qui ne ressortent pas avec un lysat total. La protéine XPC étant localisée dans le noyau, l'utilisation de lysats totaux atténue donc l'effet d'une déficience pour la protéine XPC. Ces résultats suggèrent que des facteurs du cytoplasme jouent un rôle lors de la réaction de réparation mise en oeuvre sur le support.

Les résultats pour le lysat XPA sont indépendants du mode de préparation de l'échantillon. Alors que nous avons observé un niveau d'ER identique entre le lysat nucléaire XPA et le lysat témoin à la concentration de 0,3 mg/mL, nous constatons qu'à la concentration de 1,6 mg/mL de protéine, les profils sont identiques en ce qui concerne le lysat total XPA et le lysat témoin. Le niveau de réparation obtenu avec un lysat total de cellules XPA^{-/-}, dans nos conditions expérimentales, est globalement de 100 %. Il est important de noter que la 8-oxoG est mieux réparée par le lysat XPA qu'un lysat témoin et ceci a aussi été observé avec un lysat nucléaire.

En conclusion, les niveaux de réparation obtenus avec notre test sur support à partir de lysats totaux sont largement supérieurs à ceux obtenus avec le test de référence en solution. Nos résultats vont donc à l'encontre de la littérature. Aux vues des résultats, obtenus avec les lysats nucléaires, sur l'effet de la concentration protéique sur les phénotypes de réparation, nous pouvons penser qu'il peut aussi y avoir un effet sur les activités d'ER des lysats totaux. Ainsi, il faudrait tester ce qui se passe avec des lysats totaux lorsque la concentration augmente. Est-ce comme avec les lysats nucléaires, la discrimination devient possible lorsque

nous réalisons la réaction d'ER sur la puce avec des concentrations protéiques plus fortes ? Néanmoins, les différences observées entre les niveaux de réparation d'un lysat total et d'un lysat nucléaire montrent que les facteurs de la réparation ne sont pas tous situés dans le même compartiment cellulaire. Il a par exemple été montré que XPA aurait, une localisation majoritairement cytoplasmique (Fung *et al.*, 2008). Ainsi, ces résultats suggèrent que suivant la nature du mélange protéique du lysat testé, les mécanismes enzymatiques sont différents. Les équilibres enzymatiques seraient déplacés, les régulations et les interactions seraient également différentes suivant si la réaction se focalise sur le matériel disponible uniquement dans le noyau ou dans la cellule entière.

C. Excision seule

Pour finir ce chapitre de l'étude au niveau basal, nous allons nous focaliser sur l'étape d'excision réalisée par les glycosylases de la voie BER. Pour cela, nous avons utilisé l'autre test disponible au laboratoire, à savoir la puce oligo. Ce test mesure l'activité d'excision de petites lésions uniquement, étape réalisée par les ADN *N*-glycosylases contenues dans un lysat cellulaire. Cette activité est mesurée sur des oligonucléotides (ODN) d'environ 40 pb. La lésion est positionnée vers l'extrémité 3' de l'ODN entre les nucléotides 31 et 34.

Ce test est donc différent de la puce plasmide puisqu'il mesure uniquement des activités de coupure et non des activités d'excision et de resynthèse. Le substrat est également beaucoup plus simple que dans le test sur puce plasmide puisqu'il s'agit ici d'un duplex linéaire d'ADN et non d'un plasmide de plusieurs kb sous une forme super enroulée. Les lésions présentes sur la puce oligo sont aussi différentes de celles présentes sur la puce plasmide puisque la puce oligo cible les lésions prises en charge uniquement par la voie BER. Les ODN comportant des modifications de base sont obtenus par synthèse chimique. Ainsi, contrairement à la puce plasmide où les lésions sont créées grâce à un traitement physique ou chimique de l'ADN, la nature du substrat est ici totalement maîtrisée. De plus, chaque ODN comporte une lésion ce qui est là aussi différent de la puce plasmide où pour chaque type de lésion, le nombre de dommages par plasmide varie.

La puce plasmide mesure l'incorporation d'un nucléotide fluorescent. Ainsi le signal fluorescent augmente, comme nous l'avons vu précédemment, en fonction du temps de la réaction et de la concentration protéique du lysat. Avec la puce oligo, en revanche, nous mesurons une disparition de la fluorescence. Au temps t_0 (avant de commencer la réaction en déposant le lysat sur la lame), le pavé est fluorescent puisque les oligonucléotides comportant

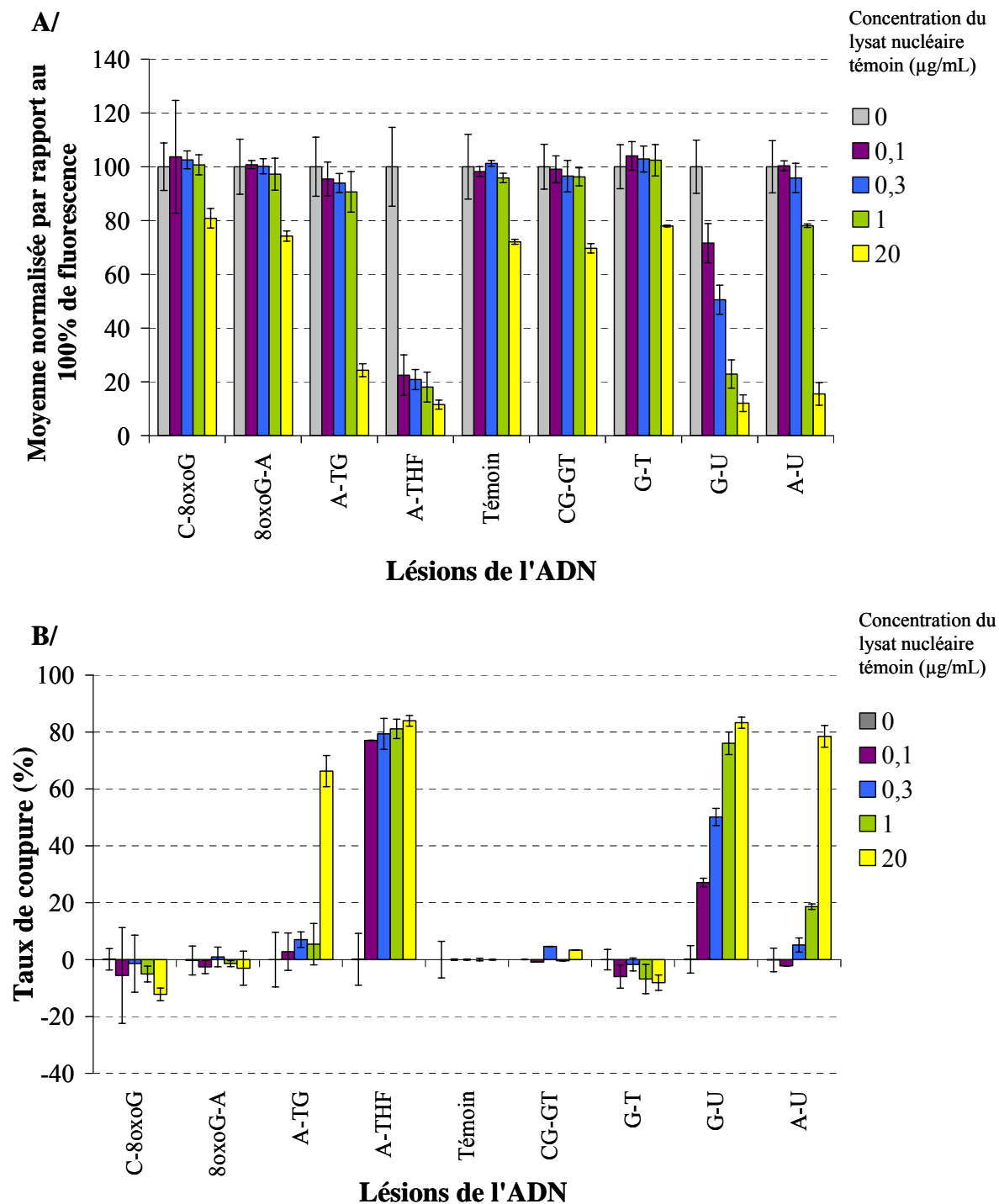


Figure 48: Profil d'incision des ODN de la puce oligo, obtenu en présence d'une gamme de concentrations protéiques croissantes d'un lysat nucléaire témoin (de 0,1 à 20 $\mu\text{g/mL}$). **A/** Les résultats sont normalisés par rapport à la moyenne obtenue pour chaque ODN des pavés sans lysat (100% de fluorescence). **B/** Taux de coupure du lysat témoin.

les lésions sont marqués à leur extrémité par un fluorophore Cy3. Plusieurs pavés incubés dans le tampon réactionnel seul (*ie.* sans lysat cellulaire) et distribués à différents endroits de la lame permettent de déterminer le 100% de fluorescence de l'expérience. Si l'oligonucléotide est excisé par les enzymes contenues dans le lysat, la fluorescence correspondant à ce dépôt d'ODN va alors diminuer. Nous pouvons quantifier précisément cette perte de signal.

Nous mesurons l'activité d'excision d'ADN *N*-glycosylases contenues dans le lysat cellulaire. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, il existe plusieurs glycosylases, chacune étant associée de façon plus ou moins spécifique à un substrat. Par exemple, la 8-oxoG est excisée majoritairement par l'enzyme OGG1, mais dans certains cas particuliers elle peut être prise en charge par une autre enzyme, NEIL1. Il existe deux classes de glycosylases : les enzymes monofonctionnelles et les enzymes bifonctionnelles, différenciées par leur capacité à hydrolyser la liaison phosphodiester (entre le sucre et le groupement phosphate). Sur la puce oligo, nous disposons d'un panel de modifications de bases qui seront prises en charge par des glycosylases de type I ou de type II. La réaction d'excision est étudiée à partir d'un lysat nucléaire. Celui-ci contient un mélange de protéines et d'enzymes, notamment celles nécessaires à l'excision de la base (activité glycosylase) et celles nécessaires à la coupure de la liaison entre le sucre et le groupement phosphate (activité AP-Endonucléase).

Toutes les activités glycosylases (hormis NEIL2 et NEIL3), à ce jour référencées, peuvent être en théorie quantifiées grâce à notre test. Nous verrons par la suite, qu'il n'est pas possible d'avoir une quantification efficace pour toutes les activités enzymatiques. La correspondance entre les lésions et les glycosylases est répertoriée dans le tableau 15 du chapitre IV (Matériels et Méthodes).

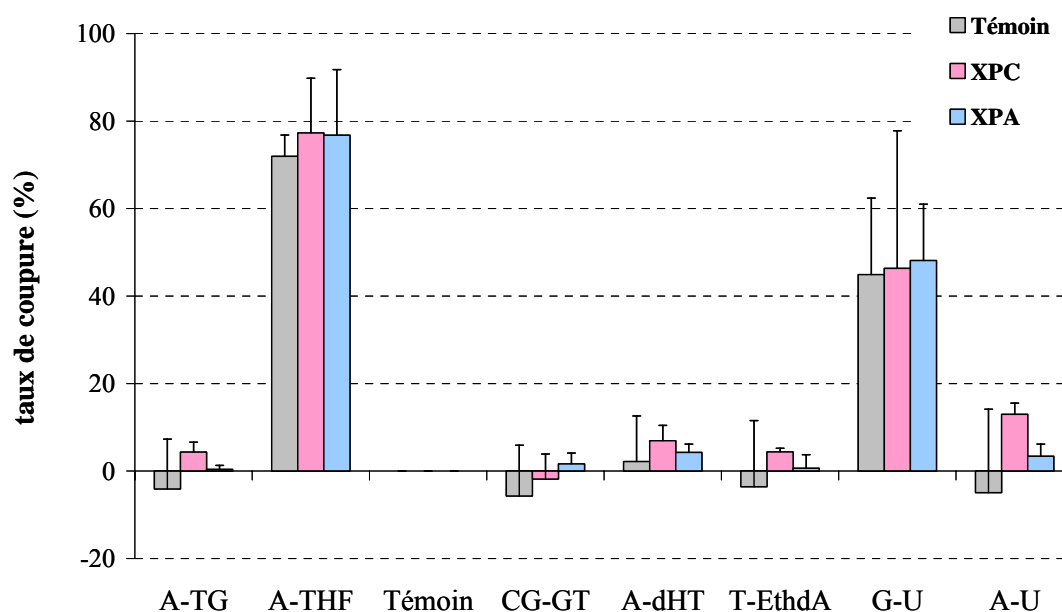
1. Activités d'excision d'un lysat nucléaire témoin : détermination des conditions de concentrations protéiques

Il a été nécessaire tout d'abord de déterminer la gamme de concentrations protéiques pour laquelle nous observons des taux de coupure spécifiques. Pour cela, nous avons réalisé une expérience sur la puce oligo en présence d'une gamme de concentration allant de 0 à 20 µg/mL pour un lysat nucléaire de fibroblastes témoin (**Figure 48**). Au-delà de 20 µg/mL, il a été vérifié à plusieurs reprises que la réaction n'est plus spécifique, les ODN présents sur le support étant dégradés de façon aspécifique. En effet, nous observons un taux de coupure de l'ODN témoin, ne comportant pas de lésion, supérieur à 30 %.

Pour chaque ODN présent sur la puce (comportant une base modifiée ou non), l'intensité de fluorescence obtenue avec le tampon réactionnel seul est fixée à 100 %. Ainsi, le profil d'excision obtenu dans la **figure 48 A/** montre l'intensité de fluorescence totale obtenue pour un lysat nucléaire témoin par rapport à ce 100 % de fluorescence. Comme nous pouvons observer sur le graphe, plus la concentration en protéines augmente, plus l'intensité relative de fluorescence diminue et cela quelle que soit la lésion considérée. Il est important de noter que l'intensité de fluorescence diminue aussi pour l'ODN témoin c'est-à-dire ne contenant pas de base modifiée. La coupure de l'ODN témoin est cependant très faible lorsque la concentration protéique est inférieure ou égale à 1 µg/mL. Lorsque la réaction est réalisée en présence de 20 µg/mL de lysat nucléaire, 30 % des ODN témoin sont coupés. Enfin, nous observons que certaines lésions sont plus coupées que d'autres ; les performances de coupure ne sont donc pas les mêmes pour toutes les lésions présentes sur le support.

Les taux de coupure, calculés pour chaque lésion, rendent compte de cette différence d'activité (**Figure 48 B/**). En effet, toutes les lésions ne sont pas incisées avec la même efficacité. Par exemple, les sites abasiques (A-THF) sont excisés à 80 % dès la plus faible concentration protéique (0,1 µg/mL). Cette lésion est donc coupée avec un très grand rendement dans nos conditions expérimentales. Pour les diols de thymine (A-TG) et l'uracile (G-U et A-U), le taux coupure maximal est obtenu à la concentration de 20 µg/mL. Il est de 66 % et de 80 % respectivement pour ces deux types de lésions. Enfin, la lésion 8-oxoG (C-8oxoG), l'adénine en face d'une 8-oxoG (8oxoG-A) ainsi que les mésappariements (CG-GT et G-T) présentent un taux de coupure nul, l'excision de ces lésions n'est donc pas efficace dans nos conditions expérimentales avec un lysat nucléaire témoin de fibroblaste. Il a déjà été montré une activité très faible de la coupure de la 8-oxoG dans des extraits totaux de fibroblastes (Cappelli *et al.*, 2000). Dans cette étude, l'excision de la 8-oxoG est 5 fois moins efficace que la coupure de l'uracile et 50 fois moins efficace que l'incision d'un site abasique. Dans notre cas, nous ne savons pas pourquoi cette lésion n'est pas excisée sur la puce oligo. Nous avons, en effet, testé plusieurs séquences d'ODN portant la modification 8-oxoG et nous n'avons pas observé de différences dans les activités de coupure (*ie.* la lésion n'est pas excisée). Ainsi est-ce que l'enzyme OGG1 est en concentration limitante dans les conditions de concentration protéique que nous utilisons ? Est-ce dû au mode de préparation des lysats nucléaires (absence d'un cofacteur essentiel) ? L'enzyme d'OGG1 est-elle moins active dans les noyaux par rapport aux mitochondries ? Cependant, il est à noter que suivant la nature des cellules utilisées pour préparer les lysats nucléaires, le taux de coupure varie entre 0 et 20 %,

A/



B/

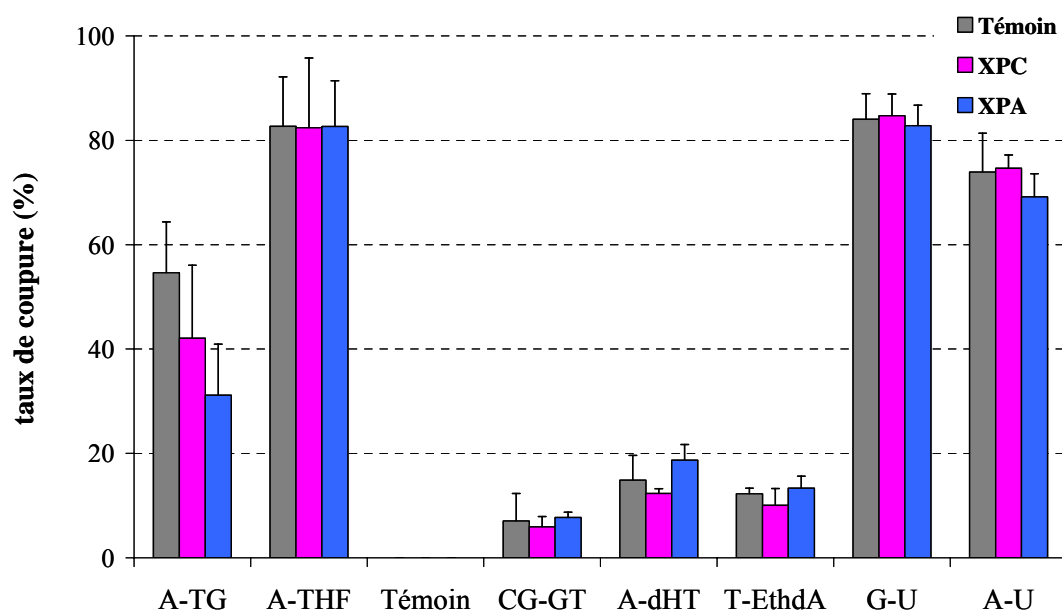


Figure 49: Profil d'incision des ODN de la puce oligo par un lysat nucléaire témoin et deux lysats nucléaires XP, en présence de deux concentrations protéiques différentes. **A/** 0,5 µg/mL de protéines. **B/** 20 µg/mL de protéines.

ce qui est en accord avec la littérature. Notre test d'excision sur support ne permet pas de mesurer des taux de coupure inférieurs à 10 %, à cause de la variabilité du test.

En conclusion, comme attendu, l'efficacité d'excision par un lysat nucléaire, de lésions réparées par des ADN *N*-glycosylases, est dépendant de la nature de la lésion et de très grandes disparités dans les efficacités sont observées. Cette première approche, avec un lysat nucléaire témoin, a permis de déterminer les concentrations protéiques à employer pour avoir une activité d'excision spécifique. Ainsi, aux vues de ces résultats préliminaires, nous avons choisi d'étudier l'excision en présence de deux concentrations protéiques : 0,5 et 20 µg/mL. La plus faible concentration a été choisie afin de pouvoir observer des différences de taux de coupure pour les lésions dont le rendement de coupure est élevé (A-THF et G-U). En effet, l'excision de ces deux lésions étant très efficace, il est judicieux de se placer à une concentration pour laquelle la réaction n'est pas encore arrivée au plateau. La concentration de 20 µg/mL nous permettra d'étudier la coupure des lésions, excisées avec une efficacité moindre (par exemple les diols de thymine et de la lésion A-U).

Nous allons maintenant nous intéresser aux activités d'excision obtenues avec des lysats de cellules XP. Ces cellules sont déficientes pour la NER mais nous avons vu qu'il existe des interactions entre la voie NER et la voie BER. Par exemple, nous avons confirmé lors de l'étude des activités d'excision-resynthèse le rôle de XPC dans la réparation des lésions prises en charge par la BER. Il s'agit donc d'étudier à l'aide de la puce oligo, si nous mesurons des activités différentes d'excision entre un lysat témoin et un lysat XP.

2. Caractérisation de phénotypes d'excision XPA et XPC

La réaction d'excision *in vitro* a donc été conduite avec des lysats nucléaires de fibroblastes à deux concentrations protéiques différentes, 0,5 et 20 µg/mL.

La **figure 49** présente les taux de coupure obtenus pour les différents lysats testés. Comme dans la figure précédente, le taux de coupure maximal des sites abasiques (80 %) est obtenu dès 0,5 µg/mL et ceci pour tous les lysats (**Figure 49 A**). La lésion G-U est excisée à 40 % lorsque la réaction est conduite en présence de 0,5 µg/mL, et là encore, pour le lysat témoin mais aussi pour les lysats XP. Les autres lésions présentent des taux très faibles d'excision à cette concentration protéique.

En conclusion, lorsque l'excision est réalisée en présence de 0,5 µg/mL de protéines, nous n'observons pas de différence dans les activités d'excision entre le lysat témoin et les lysats XP.

Lorsque l'excision est réalisée en présence de 20 µg/mL, nous observons des coupures spécifiques pour les lésions A-TG, CG-GT, A-dHT et T-EthdA alors qu'elles n'étaient pas coupées avec 0,5 µg/mL (**Figure 49 B**). Le taux de coupure maximal de la lésion G-U (80 %) est, lui, atteint à 20 µg/mL.

A cette concentration, nous pouvons observer que les lysats XP ont des activités d'excision différentes de celles obtenues avec le lysat témoin pour la lésion diols de thymine. En effet, cette lésion est moins coupée par le lysat XPA (30 %) que par le lysat témoin (55 %). Le lysat XPC excise aussi moins cette lésion (42 %), mais la différence est moins franche. Les autres lésions présentes sur la puce sont excisées de façon équivalente par les trois lysats testés.

En conclusion, la concentration de 0,5 µg/mL de protéines, ne révèle pas de différence dans les activités d'excision des différents lysats testés, alors qu'à 20 µg/mL, les diols de thymine sont moins excisés dans les lysats XP par rapport au lysat témoin. En effet, le lysat XPA excise pratiquement 2 fois moins cette lésion que le témoin. Ce résultat a également été confirmé à partir d'une autre souche de cellules XPA (GM04312) pour laquelle nous obtenons un taux de coupure de 32 %. Cette lésion est prise en charge chez les Mammifères par les glycosylases NTH1 et NEIL1. Ainsi, nous pouvons penser que les activités de ces enzymes sont moins efficaces dans les lysats XP.

Le **tableau 11** récapitule les niveaux relatifs d'incision des différents lysats. Le niveau du lysat témoin est fixé à 100% (référence de l'expérience).

	voie BER			
	Thymine glycol	site abasique	G-U	A-U
Témoin	100 (+/- 2)	100 (+/- 1)	100 (+/- 2)	100 (+/- 3)
XPA	56 (+/- 8)	101 (+/- 2)	101 (+/- 2)	91 (+/- 2)
XPC	88 (+/- 1)	100 (+/- 2)	101 (+/- 1)	94 (+/- 3)

Tableau 11 : Niveaux d'excision de lysats nucléaires de fibroblastes de patients XP

De façon surprenante, l'activité d'excision du lysat XPC est globalement identique à celle du lysat témoin. Rappelons, que sur la puce plasmide les activités d'ER des lésions prises en charge par la BER sont significativement inférieures à celles obtenues pour le lysat témoin. Ainsi à la différence de la puce plasmide, la puce oligo ne permet pas de confirmer la

déficience des patients XPC pour la réparation des « petites » lésions. Il faut souligner que le test de mesure des activités d'excision est un système simplifié par rapport à la puce plasmide du fait entre autre de la longueur de l'ODN. En effet, il est admis qu'un duplex de 40 pb ne pourra recevoir l'ensemble des facteurs de la réparation. La protéine XPC étant une grosse protéine (125 kDa), il est possible qu'elle ne puisse pas se fixer sur l'ODN dans nos conditions expérimentales. Ainsi, nous ne pourrions pas observer l'effet d'une déficience pour cette protéine sur la puce oligo. Par ailleurs, nous avons vu que la concentration protéique joue un rôle important lors de la mesure d'activités d'ER. Nous pouvons penser que la concentration protéique requise pour la mesure d'activités d'excision est trop faible pour pouvoir observer une implication des protéines de la NER dans la voie BER.

Par ailleurs, nous observons une activité APE1 très forte sur la puce oligo. En effet, le niveau d'excision des sites abasiques est très élevé par rapport aux autres lésions, l'activité étant maximale dès les plus faibles concentrations protéiques (0,1 µg/mL). Nous observons que l'activité de cette enzyme est la même dans tous les lysats testés. Il a été montré que les lysats cellulaires contenaient une grande quantité d'APE1 par rapport aux autres glycosylases (Waters *et al.*, 1999).

II. Caractérisation d'activités de réparation de l'ADN en réponse à un traitement génotoxique

Nous avons observé qu'il était impossible de discriminer les activités d'ER du lysat XPA de celles du lysat témoin, à l'état basal, lorsque les concentrations protéiques sont limitantes. Nous avons opté pour la même stratégie qu'avec le modèle HeLa siRNA en analysant la réponse en termes d'activités d'ER en réponse à un traitement génotoxique. En effet, comme pour le modèle siRNA, nous voulons nous rapprocher des conditions du test de diagnostic de référence, l'UDS, où l'efficacité de la réparation de l'ADN est mesurée après une irradiation UV des cellules.

A. Réponse à une irradiation UVB

La première étape a consisté à analyser l'effet du traitement UVB au niveau cellulaire par la mesure de la cytotoxicité et l'analyse du cycle cellulaire.

1. Etudes préliminaires

Comme pour le modèle siRNA, nous avons utilisé le test MTT pour mesurer la cytotoxicité d'une irradiation UVB sur le modèle fibroblaste. Cette analyse nous permet de

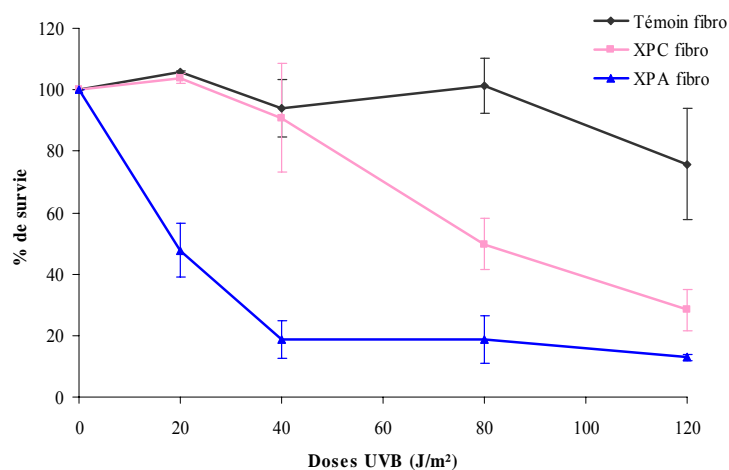


Figure 50: Courbes de cytotoxicité 24h après l'irradiation UVB de fibroblastes témoin et XP.

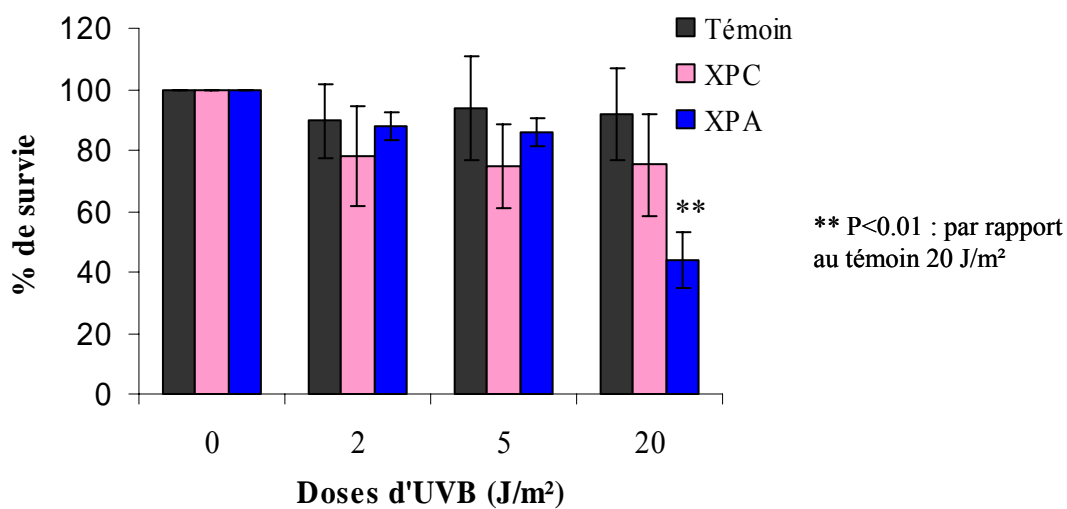


Figure 51: Cytotoxicité de faibles doses d'UVB (0 à 20 J/m²) sur les fibroblastes témoin et XP.

comparer les différentes réponses en terme de survie des différents souches utilisées pour cette étude (témoin, XPA^{-/-} et XPC^{-/-}).

a) Survie cellulaire après une irradiation UVB

La **figure 50** montre la survie cellulaire 24 h après une irradiation UVB des cellules à des doses comprises entre 0 et 120 J/m². Comme pour le modèle siRNA, les cellules témoins sont moins sensibles au traitement UVB que les cellules XP. Cependant, les deux modèles cellulaires (HeLa siRNA et fibroblastes) ne réagissent pas de la même façon. En effet, alors que les cellules HeLa siRNA XPA et XPC présentent la même sensibilité aux UVB, les fibroblastes XPA sont beaucoup plus sensibles que les fibroblastes XPC, et beaucoup plus sensibles que ce qui est obtenu avec le modèle HeLa siRNA. Ainsi, dès la dose de 20 J/m², 50 % des fibroblastes XPA sont morts alors qu'il fallait une dose de 100 J/m² avec le modèle siRNA pour atteindre cette même cytotoxicité. Cette différence de cytotoxicité entre les deux modèles montre les limites d'utilisation du modèle siRNA puisque les cellules ne réagissent pas de la même façon que les cellules transformées, issues directement d'un patient XP.

En conclusion, la DL50 est obtenue pour une dose supérieure à 120 J/m² pour les cellules témoins, pour une dose d'environ 80 J/m² pour les fibroblastes XPC et pour une dose d'environ 20 J/m² pour les fibroblastes XPA. L'hypersensibilité des cellules XPA aux UV a déjà été montrée (Abrahams *et al.*, 1976; van Hoffen *et al.*, 2003; de Waard *et al.*, 2008). Nos résultats sont donc cohérents avec la littérature. Les cellules XPC^{-/-} sont déficientes pour le GG-NER uniquement alors que les cellules XPA^{-/-} sont déficientes à la fois pour le GG et le TC-NER. Il a été suggéré que les cellules XPA sont hypersensibles aux UV et sont plus sensibles que les cellules XPC, du fait de cette déficience dans les deux voies de la NER (van Hoffen *et al.*, 2003).

Nous avons aussi étudié la cytotoxicité des UVB avec une gamme de doses plus restreinte (entre 0 et 20 J/m²). Nous n'observons aucune modification significative de la survie cellulaire après 2 et 5 J/m² (**Figure 51**). Les pourcentages de survie ne descendent pas en dessous de 85 %. En revanche, une dose de 20 J/m² diminue de façon significative la survie de la souche XPA par rapport à la souche témoin (50 % de survie), tandis que la survie des cellules XPC^{-/-} n'est pas diminuée à cette dose.

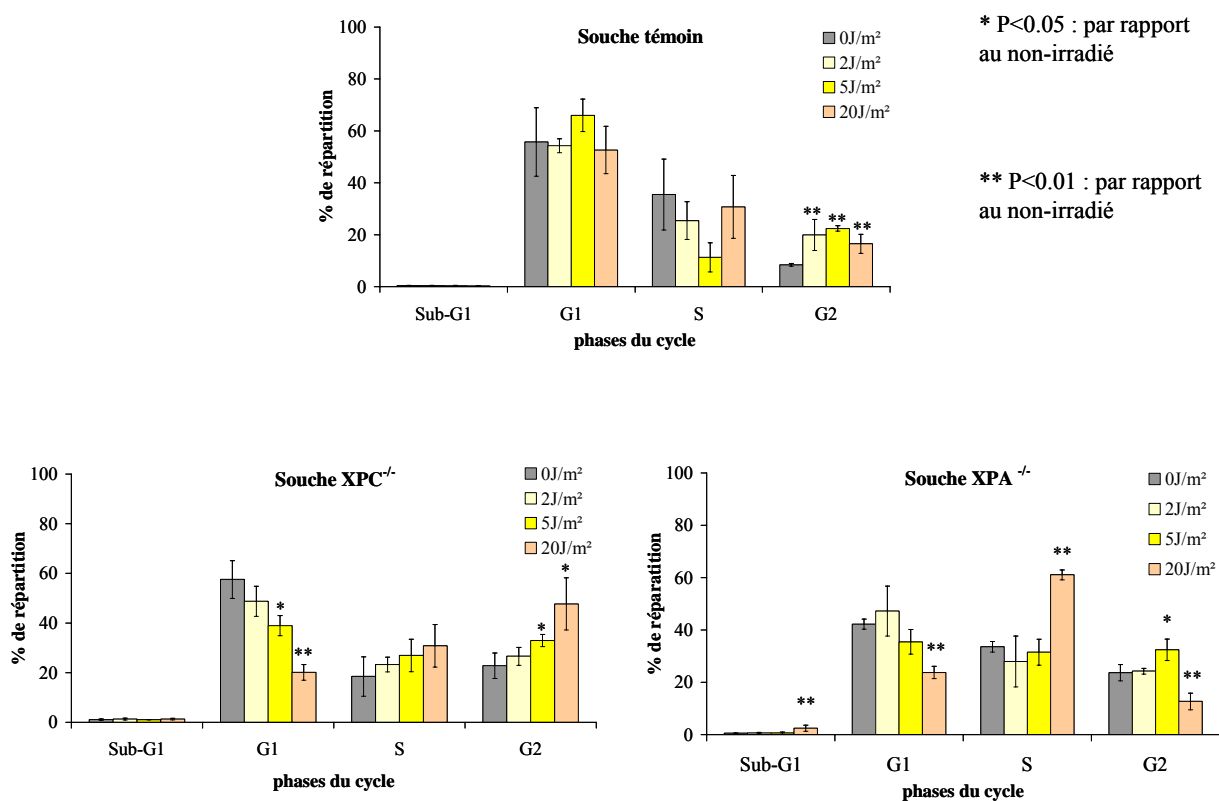


Figure 52: Cycle cellulaire des fibroblastes témoin et XP, 24 h après une irradiation UVB à de faibles doses (0 à 20 J/m²).

Comme pour le modèle siRNA, nous voulions connaître l'impact de la cytotoxicité d'un traitement génotoxique sur les activités de réparation mesurées avec notre test. En effet, une population cellulaire présentant une forte mortalité ne va pas réparer l'ADN de la même façon qu'une population faiblement affectée par ce même traitement (Courdavault *et al.*, 2004b). Nous allons également analyser si l'apoptose et les arrêts de cycle suite à une irradiation UV peuvent avoir un effet sur les activités de réparation mesurées avec notre test *in vitro*.

b) Analyse du cycle cellulaire après une irradiation UVB

Le cycle cellulaire des lignées de fibroblastes a été analysé par cytométrie en flux 24 h après l'irradiation UVB. Les résultats présentés dans la **figure 52** sont issus de trois expériences indépendantes réalisées sur les fibroblastes de patients. Des tests de *Student* ont permis de déterminer si le pourcentage de répartition des cellules dans une phase donnée après traitement UVB, est significativement différent du pourcentage obtenu pour les cellules non-irradiées.

Lors de la phase G1 du cycle cellulaire, les cellules n'ont pas encore répliqué leur ADN et on donc une quantité « n » d'ADN. La phase G2 correspond à la phase précédant la mitose où la cellule se prépare à se diviser. En G2, la quantité d'ADN est de « 2n ». Entre G1 et G2, il y a la phase S, pendant laquelle la cellule réplique l'ADN c'est-à-dire qu'elle fait une copie de l'ensemble du génome. Lors de cette phase, la quantité d'ADN est entre « n » et « 2n ». Il existe aussi la phase Sub-G1 où les cellules possèdent une quantité d'ADN inférieure à « n ». Cela correspond aux corps apoptotiques, c'est-à-dire à la fragmentation de l'ADN cellulaire. Lors de l'apoptose, une des caractéristiques de ce mécanisme de mort programmé, est la fragmentation de l'ADN. Les débris cellulaires ont été auparavant exclus par sélection de la population cellulaire la plus représentative en fonction de la taille et de la granulométrie. Ainsi les débris cellulaires ne constituent pas la population en Sub-G1. Après un traitement génotoxique, les cellules peuvent s'arrêter dans leur progression dans le cycle cellulaire. Les arrêts peuvent se faire en phase G1, S ou G2/M. Suivant la phase pendant laquelle la cellule s'arrête, des cascades de signalisation différentes sont mises en place.

La première observation concerne le cycle cellulaire des trois différentes souches au niveau basal, c'est-à-dire sans traitement (Figure 52). La souche témoin a la grande majorité de ses cellules en phase G1 et très peu en phase G2 (environ 10 %). Les souches XP ont, elles, deux fois plus de cellules en phase G2 que la souche témoin (environ 20 % pour XPC et

environ 25 % pour XPA). Ainsi, les mutations dans les gènes de la réparation ont un impact sur le cycle à l'état basal et l'accumulation des cellules XP en phase G2 pourrait révéler leur fragilité.

Après une irradiation UVB ($< 20 \text{ J/m}^2$), la proportion des cellules témoin en phase G2 augmente de façon significative et ceci dès la plus faible dose (2 J/m^2). Cet arrêt en G2 est également observé pour la souche XPC^{-/-}. Cependant l'arrêt est plus marqué que pour la souche témoin puisqu'après 20 J/m^2 , environ 20 % des cellules témoin sont en phase G2 alors que pratiquement 50 % des cellules XPC sont arrêtées dans cette phase. Ainsi, une irradiation UVB à de très faibles doses très peu cytotoxiques pour la cellule, modifie le cycle cellulaire. Celui-ci est d'autant plus perturbé que les cellules sont déficientes pour la réparation (*ie.* souche XPC). Il a été montré que des fibroblastes en culture primaire s'arrêtent en phase G1 après une irradiation UVB (Courdavault *et al.*, 2004b), mais que les lignées de kératinocytes s'arrêtent préférentiellement en G2/M (Athar *et al.*, 2000). L'arrêt en G1 serait dépendant de p53, alors que l'arrêt en G2 serait indépendant de cette protéine (Herzinger *et al.*, 1995; Gabrielli *et al.*, 1997). Dans les lignées transformées par SV40, le statut de p53 est modifié, donc il est cohérent d'observer un arrêt en G2/M avec nos lignées de fibroblastes. L'arrêt en G2/M, tout comme un arrêt en G1, constitue une pause pour la cellule pendant laquelle elle peut réparer l'ADN ou mettre en place des mécanismes de mort programmée.

La souche XPA réagit de façon différente par rapport aux deux autres souches. Jusqu'à 5 J/m^2 , les cellules s'accumulent préférentiellement en G2 comme le font les deux autres souches. En revanche, le cycle cellulaire est très perturbé lorsque les cellules ont été irradiées avec 20 J/m^2 , dose à laquelle beaucoup de cellules meurent (cytotoxicité de 55 %). La proportion de cellules en phase sub-G1 augmente de façon significative à cette dose. La phase sub-G1 correspond aux cellules dont la quantité d'ADN est inférieure à « n » et donc généralement aux cellules en cours d'apoptose. Ainsi, 24 h après une irradiation de 20 J/m^2 , 55 % des cellules XPA meurent ; l'analyse du cycle cellulaire résultant en témoigne. Le cycle cellulaire obtenu pour les cellules XPA en réponse à l'irradiation est en accord avec les travaux de De Waard *et al.*, où des cellules de souris XPA^{-/-} (MEF) sont à 60 % en Sub-G1 48 h après une irradiation UVC de 4 J/m^2 (de Waard *et al.*, 2008). Les auteurs parlent de phénotype hyperapoptotique pour les cellules XPA.

L'analyse du cycle cellulaire montre que suivant la dose d'UVB et la souche considérée, la réponse n'est pas la même. Cette analyse souligne l'extrême sensibilité des cellules XPA à des doses considérées très légères pour des cellules saines. La mesure de la cytotoxicité et l'analyse du cycle cellulaire confirment donc le phénotype sévère associé à ces cellules.

Après avoir étudié l'effet d'une irradiation UVB au niveau cellulaire, nous allons maintenant étudier l'influence d'une irradiation UVB sur les activités de réparation *in vitro* de lysats nucléaires de cellules témoin et XP. Nous allons aborder la réponse aux UVB en termes d'activités d'ER en étudiant l'impact de différents facteurs (la mortalité, l'apoptose, les arrêts de cycle) sur cette réponse.

2. Activité de réparation de l'ADN en réponse à une irradiation UV

La réponse en termes d'activités de réparation de l'ADN suite à une irradiation UVB a été étudiée, dans un premier temps, en irradiant les cellules à des doses entraînant au maximum 50 % de cytotoxicité chez la souche la plus sensible. Ainsi, les fibroblastes ont été irradiés avec 20 J/m² et la réaction d'ER a été conduite 24 h après l'irradiation en présence de 0,3 mg/mL pendant 2 h.

Comme pour le modèle siRNA, nous avons constaté que le lysat de cellules XPA irradiées à cette dose de 20 J/m², présente des activités d'ER non spécifiques (données non montrées). En effet, le niveau de fluorescence totale obtenu pour ce lysat augmente fortement lorsque les cellules ont été irradiées avec 20 J/m². Cependant, cette augmentation est non spécifique puisque le niveau d'ER du plasmide contrôle augmente lui aussi grandement. Les cellules XPA, plus sensibles que les cellules témoin à une irradiation UV initient des processus d'apoptose à une dose de 20 J/m², comme nous l'a révélé l'étude du cycle cellulaire. Cette réponse particulière des cellules XPA face à l'irradiation UVB, à cette dose, se traduirait donc sur la puce plasmide par des coupures non-spécifiques de l'ADN fixés sur le support, comme nous l'avons déjà évoqué avec le modèle siRNA.

En conclusion, une irradiation de 20 J/m² entraîne une mortalité de 55 % chez les cellules XPA et une augmentation de la mort par apoptose, conduisant à une réaction aspécifique sur la puce plasmide. Ainsi, nous avons décidé de travailler avec des doses plus faibles d'UVB, très peu cytotoxiques pour ne pas biaiser la réponse observée sur la puce.

Les lignées de fibroblastes ont donc été irradiées à la dose de 5 J/m² ; la réaction d'ER est réalisée 24 h après l'irradiation et met en jeu 0,3 mg/mL de protéines. En réponse à

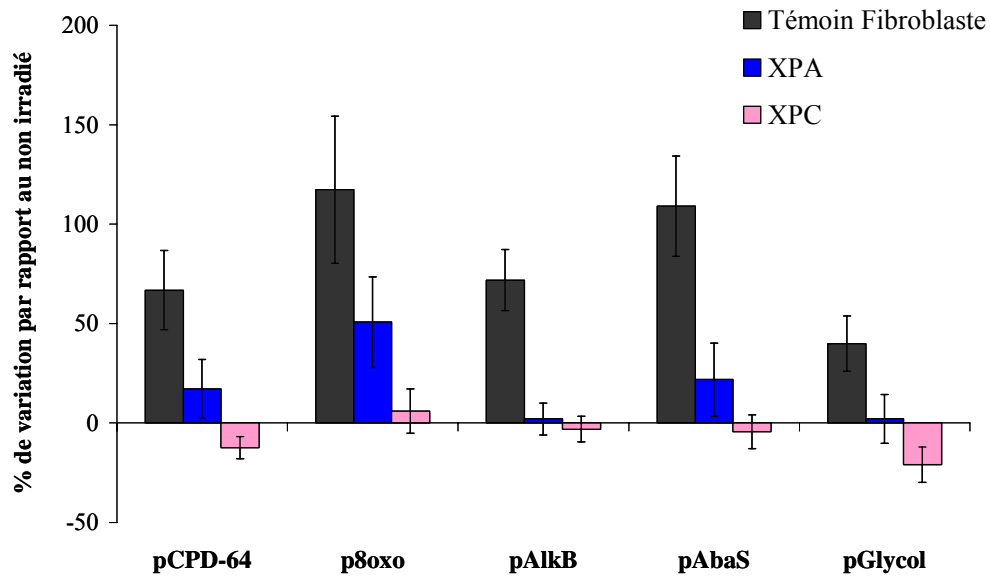


Figure 53: Pourcentage de variation de l'excision-resynthèse, en présence de 0,3 mg/mL de protéines, entre le lysat de cellules irradiées avec 5 J/m² d'UVB et le lysat de cellules non-irradiées. Pour chaque lysat de cellules irradiées a été calculé un pourcentage de variation de l'intensité totale de fluorescence par rapport au lysat réalisé sur des cellules non-irradiées.

l'irradiation UVB, nous observons des activités d'excision-resynthèse différentes suivant les lysats testés (**Figure 53**).

L'activité d'ER du lysat nucléaire témoin augmente lorsque les cellules ont été irradiées avec 5 J/m². La réparation de toutes les lésions présentes sur le support est concernée par cette stimulation post-UVB. Cependant, nous notons des niveaux de stimulation différents suivant les lésions. Ainsi, le niveau de réparation de la 8-oxoG augmente de 120 % par rapport au lysat de cellules non-irradiées, celui des sites abasiques augmentant lui aussi beaucoup, par rapport aux autres lésions (110 %). L'ER des photoproduits et des bases alkylées est plus faiblement stimulée que celle des deux lésions précédemment évoquées (environ 70 %). Il est intéressant de noter que ce sont les activités de deux lésions prises en charge par la BER qui sont les plus stimulées après une irradiation UV. Nous avons obtenu le même résultat avec le modèle siRNA : c'est pour la 8-oxoG que la stimulation était la plus élevée.

L'irradiation n'a pas d'effet sur les activités d'ER du lysat XPC et ceci quelle que soit la lésion considérée (prises en charge par la BER ou la NER). La déficience pour la protéine XPC ne permet donc pas de stimuler les activités de réparation en réponse à l'irradiation UVB. Ainsi, nous montrons que la protéine XPC est nécessaire pour observer une augmentation des activités de réparation sur la puce lorsque la réaction est conduite en présence de 0,3 mg/mL de protéines.

L'irradiation a un effet sur l'activité d'ER du lysat nucléaire XPA pour la 8-oxoG uniquement. En effet, l'activité de réparation de cette lésion est augmentée de 50 % lorsque les cellules XPA ont été irradiées avec 5 J/m². Cependant, la stimulation observée pour cette lésion est plus faible que celle observée avec le lysat témoin. Le niveau de réparation des autres lésions ne varie pas. Alors que nous n'observons aucune différence d'activités de réparation au niveau basal avec 0,3 mg/mL de protéines entre un lysat témoin et un lysat XPA, nous observons qu'en réponse à l'irradiation UVB, il devient possible de discriminer les activités de ces deux lysats. Ainsi, suite à une irradiation UVB, les cellules témoin et les cellules XPA ne répondent pas de la même façon, ce qui laisse penser que la réponse cellulaire mise en place fait, notamment, intervenir le facteur XPA.

En conclusion, la réponse des cellules HeLa siRNA et fibroblastes témoin suit le même schéma, à savoir une stimulation de l'excision-resynthèse du lysat témoin à 0,3 mg/mL de protéines (0,4 mg/mL pour les HeLa siRNA) lorsque les cellules sont irradiées avec 5 J/m²

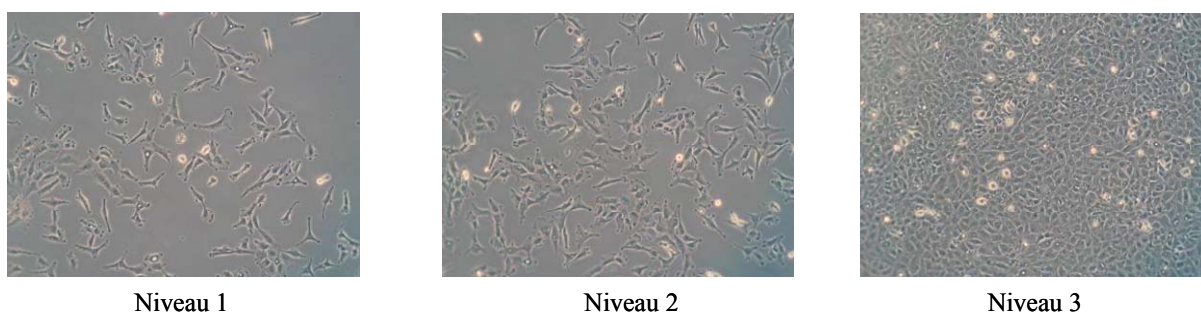


Figure 54: Photos des fibroblastes témoins juste avant l'irradiation et présentant les différents niveaux de confluence. Du moins au plus confluent: niveau 1 < niveau 2 < niveau 3.
Grossissement: x43

d'UVB. Cette stimulation ne concerne globalement pas les lysats XP (hormis la 8-oxoG dans les lysats de fibroblastes XPA) et cela dans les deux modèles cellulaires.

En reproduisant nos expériences, nous avons observé une variabilité dans nos résultats en réponse aux UVB : la stimulation n'était pas toujours aussi nette d'une expérience à l'autre. Nous nous sommes donc demandés si la confluence des cellules au moment de l'irradiation n'était pas un paramètre expérimental introduisant un biais dans nos résultats. Est-ce que l'état de prolifération cellulaire au moment de l'irradiation influe sur les activités d'ER obtenues sur la puce ?

L'effet stimulateur d'une très faible dose d'UVB a donc ensuite été approfondi en étudiant l'effet de la confluence des cellules au moment de l'irradiation. En effet, nous avons cherché à savoir si la stimulation des activités d'ER observées sur la puce avec un lysat témoin pouvait être reliée à l'état de prolifération suite à une irradiation UV.

3. Effet de la confluence des cellules au moment de l'irradiation

Nous avons donc choisi d'étudier l'effet de la prolifération cellulaire au moment de l'irradiation sur la survie cellulaire, le cycle cellulaire et les activités d'ER sur la puce plasmide. Il a déjà été montré que la confluence des cellules au moment d'un traitement génotoxique peut influencer sur la survie cellulaire et la réparation des photoproduits (Carvalho *et al.*, 2003; da Costa *et al.*, 2008). Ainsi, il est important d'analyser dans notre cas, avec les doses d'UVB que nous employons, quelle est l'influence de la confluence sur les paramètres analysés aux niveaux cellulaire et biochimique.

Pour étudier l'effet de la prolifération cellulaire au moment de l'irradiation, les cellules ont étéensemencées à trois densités différentes dans des boîtes de culture de 10 cm de diamètre. Trois niveaux de confluences ont été choisis :

- niveau 1 : les cellules sont très peu confluentes au moment de l'irradiation (< 50 %)
- niveau 2 : les cellules sont peu confluentes au moment de l'irradiation (70 %)
- niveau 3 : les cellules sont confluentes à 100% au moment de l'irradiation

La **figure 54** montre des photos de fibroblastes témoin juste avant l'irradiation. Les trois niveaux de confluence peuvent ainsi être appréciés.

La stimulation de l'activité d'ER observée précédemment avec le lysat de fibroblastes témoin (Figure 53) a été obtenue lorsque les cellules ont été irradiées au niveau 1 de confluence.

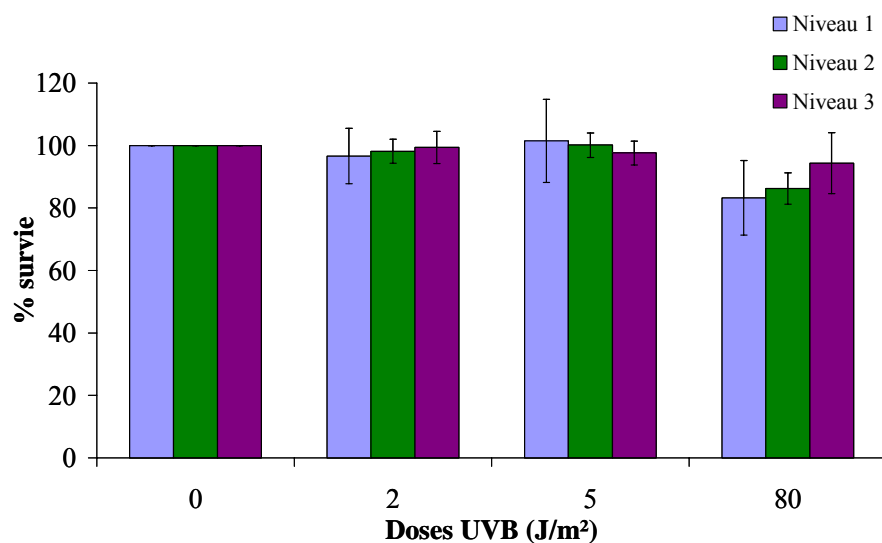


Figure 55: Cytotoxicité des UVB sur les fibroblastes témoin ensemencés à trois niveaux de confluence différents (1, 2 et 3).

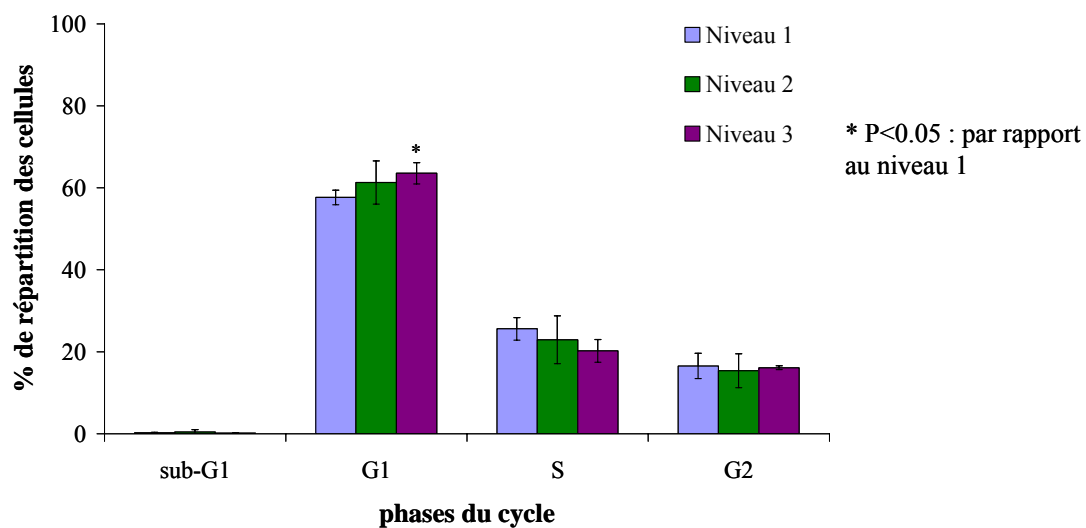


Figure 56: Répartition des cellules dans le cycle cellulaire juste avant l'irradiation UVB.

a) Confluence des cellules et cytotoxicité des UVB

Les fibroblastes témoins (*ie.* cellules saines) ont été irradiés à deux très faibles doses (2 et 5 J/m²) et à une plus forte dose (80 J/m²). L'objectif est d'analyser si à ces doses, la confluence au moment de l'irradiation exerce un effet au niveau de la survie. Pour cela, nous utilisons le test MTT ; les cellules ont été irradiées aux trois niveaux de confluence (1 à 3) et le pourcentage de survie est quantifié 24 h après le traitement.

Les résultats présentés dans la **figure 55** ont été établis à partir de cinq expériences indépendantes. Comme nous l'avons vu précédemment, l'irradiation UVB à des doses inférieures ou égales à 80 J/m² a très peu d'effet sur la survie des cellules témoins. Ainsi aux doses très faibles (2 et 5 J/m²), aucun effet significatif n'est observé sur les fibroblastes témoins et ceci quel que soit le niveau de confluence des cellules au moment du traitement UVB. A une dose plus élevée (80 J/m²), il semble que plus les cellules sont confluentes, plus elles sont résistantes à l'irradiation, mais les différences ne sont pas significatives. Cette observation va dans le sens de travaux déjà publiés dans la littérature (da Costa *et al.*, 2008). En conclusion, la confluence des cellules n'a pas d'effet sur la cytotoxicité de l'irradiation UVB aux doses utilisées pour étudier la réparation sur la puce plasmide c'est-à-dire après une irradiation de 5 J/m².

b) Confluence des cellules et cycle cellulaire

La **figure 56** montre la répartition des cellules dans le cycle au moment de l'irradiation (t_0) pour les différents niveaux de confluence. Le cycle cellulaire est globalement le même pour les niveaux de confluence 1 et 2. En revanche, nous observons, une part plus élevée des cellules présentes dans la phase G1 lorsque les cellules ont étéensemencées à la plus forte densité. Cette constatation est en faveur d'un métabolisme différent dans les cellules confluentes. Elles répliquent moins leur ADN et ceci est confirmé par la plus forte proportion de cellules en phase G1 pour le niveau de confluence 3.

Le cycle cellulaire a ensuite été étudié 24 h après l'irradiation des fibroblastes témoins (*ie.* cellules saines) à deux très faibles doses (2 et 5 J/m²) et à une plus forte dose (80 J/m²) (**Figure 57**). Lorsque les cellules sont irradiées aux très faibles doses, le cycle cellulaire n'est pratiquement pas perturbé par l'irradiation et ce quel que soit le niveau de confluence au moment du traitement UVB.

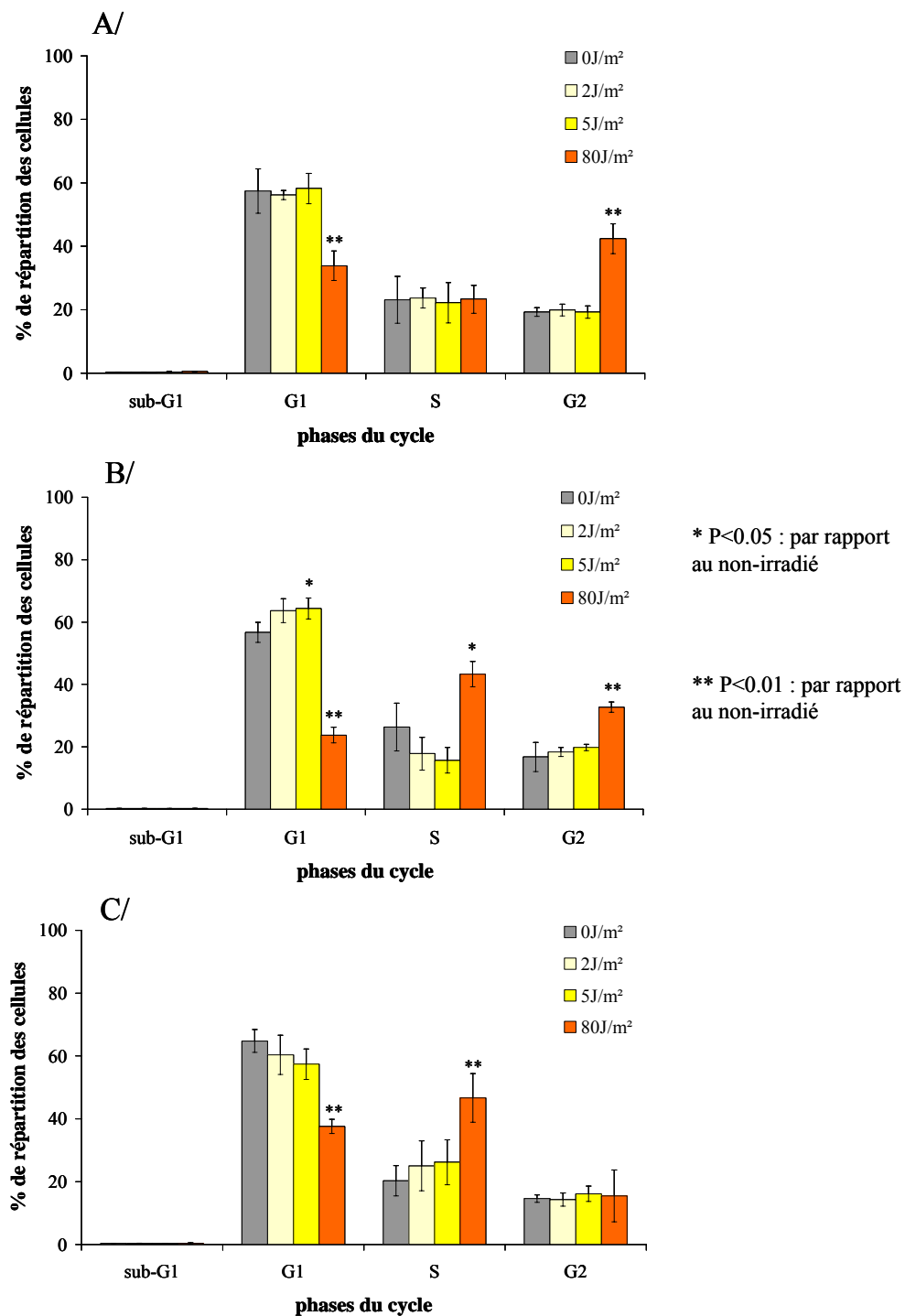


Figure 57: Cycle cellulaire après une irradiation UVB à des doses comprises entre 0 et 80 J/m², de fibroblastes témoin ensemencés à trois niveaux de confluence différents. **A/** Niveau de confluence 1 (les cellules sont très peu confluentes). **B/** Niveau de confluence 2 (les cellules sont peu confluentes). **C/** Niveau de confluence 3 (les cellules sont confluentes à 100 %).

Lorsque les cellules sont irradiées à la plus forte dose (80 J/m^2), le cycle cellulaire est modifié par rapport au cycle obtenu avec les cellules non-irradiées. Ainsi, les cellules très peu confluentes (niveau 1) au moment de l'irradiation s'accumulent dans la phase G2 (**Figure 57 A/**). Cet arrêt en phase G2 marque l'impossibilité des cellules à progresser dans le cycle et à se diviser (entrée dans la phase M).

Lorsque les cellules peu confluentes (niveau 2) sont irradiées à la même dose, les cellules s'accumulent également en phase G2 mais une proportion non négligeable des cellules est également retrouvée en phase S (**Figure 57 B/**).

Lorsque les cellules sont confluentes (niveau 3) au moment de l'irradiation, il n'y a pas d'accumulation des cellules dans la phase G2, par contre une grande proportion des cellules sont en phase S (**Figure 57 C/**).

Ainsi, la confluence des cellules au moment de l'irradiation a un effet sur la répartition des cellules dans le cycle, 24 h après le traitement UVB. Lorsque les cellules ne sont pas confluentes, elles marquent un arrêt en G2, alors que plus les cellules sont confluentes lors de l'irradiation plus elles s'accumulent dans la phase S. L'accumulation des cellules en phase G2 correspond à une pause pour que les cellules aient le temps de réparer les dommages occasionnés dans l'ADN.

L'effet de l'irradiation sur le cycle cellulaire est observable uniquement après la dose de 80 J/m^2 . Il s'agit maintenant d'étudier l'effet de la confluence sur les activités de réparation mesurées sur la puce plasmide. Seules les très faibles doses ($< 5 \text{ J/m}^2$) ont été testées pour cette étude puisque nous avons vu précédemment que la stimulation n'a lieu qu'à ces doses très faibles.

c) Confluence des cellules et activités d'excision-resynthèse

Les fibroblastes témoins ont été irradiés sous la lampe UVB à la dose de 5 J/m^2 après avoir étéensemencés aux trois niveaux de confluence. Les activités d'excision-resynthèse sont quantifiées 24 h après l'irradiation à partir de lysats nucléaires. La concentration protéique lors de la réaction d'excision-resynthèse est de $0,3 \text{ mg/mL}$. Les résultats ci-dessous ont été obtenus à partir des deux expériences biologiquement indépendantes c'est-à-dire que les cellules ont été préparées et traitées de façon indépendante.

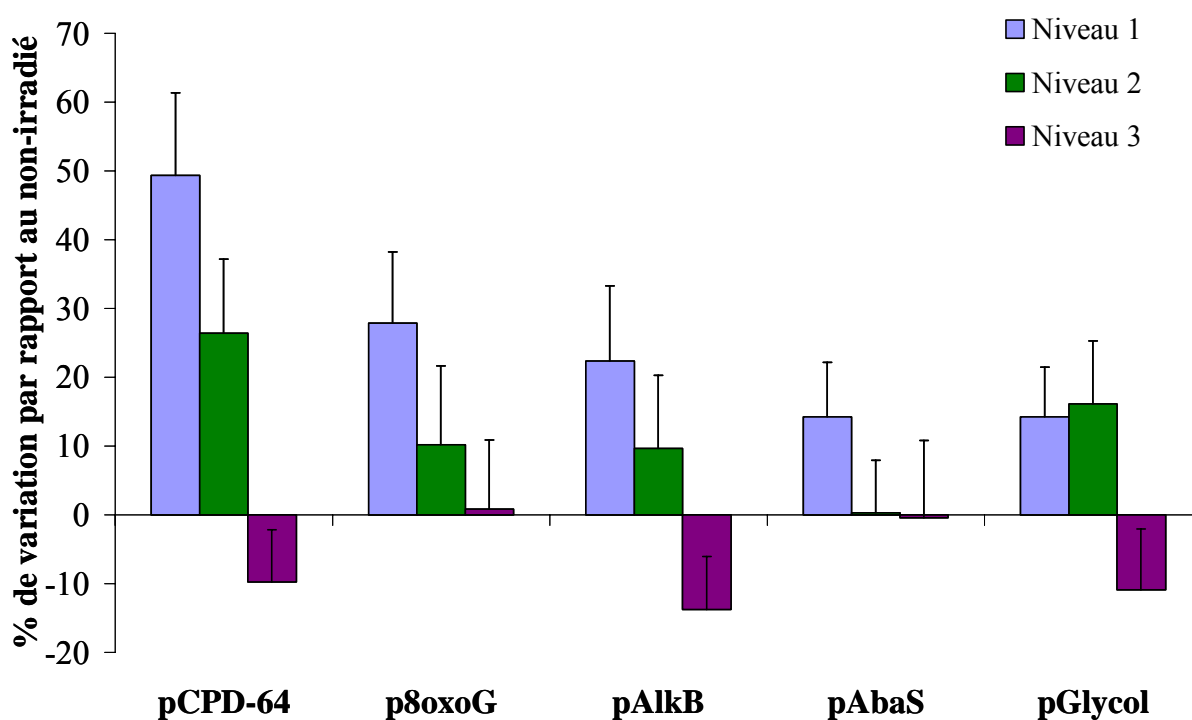


Figure 58: Pourcentage de variation de l'excision-resynthèse, en présence de 0,3 mg/mL de protéines, entre le lysat de cellules irradiées avec 5 J/m² d'UVB et le lysat de cellules non-irradiées. Pour chaque niveau de confluence, l'intensité de fluorescence correspondant au lysat de cellules irradiées a été exprimée suivant un pourcentage de variation par rapport à l'intensité de fluorescence du lysat de cellules non-irradiées.

Comme pour les expériences sur la réponse en terme d'activités de réparation de l'ADN après une irradiation UVB, nous avons exprimé l'intensité de fluorescence totale du lysat de cellules irradiées selon un pourcentage de variation par rapport à l'intensité de fluorescence totale obtenue pour le lysat de cellules non-irradiées. Ainsi, la **figure 58** montre clairement que suivant le niveau de confluence au moment de l'irradiation, les activités d'ER sont différentes. En effet, la stimulation des activités d'ER est maximale lorsque les cellules sont très peu confluentes (niveau 1). Les résultats présentés dans la figure 53 avaient été obtenus avec ce même niveau de confluence. Contrairement à la figure 53, le pourcentage de variation est ici maximal pour le plasmide contenant des photoproduits (stimulation de 50 %). Les pourcentages de variation d'ER des autres lésions sont plus faibles que dans la figure 53 ; cette différence de résultats peut être attribuée à la variabilité biologique et au fait que la figure 53 témoigne d'une seule série d'échantillons.

Lorsque les cellules sont plus confluentes au moment de l'irradiation, la stimulation des activités de réparation diminue franchement pour devenir inexistante lorsque les cellules sont au niveau de confluence maximal (niveau 3). La réparation de toutes les lésions présentes sur la puce suit la même évolution : le niveau de réparation diminue lorsque les cellules sont confluentes au moment de l'exposition aux UVB.

En conclusion, lorsque les cellules sont irradiées avec une très faible dose ($< 5 \text{ J/m}^2$), la confluence n'a pas d'effet ni sur la cytotoxicité des UVB ni sur le cycle cellulaire. Cependant, elle a un effet sur l'activité de réparation puisque la stimulation des activités d'ER n'est observable qu'après l'irradiation de cellules très peu confluentes.

La stimulation observée après une irradiation de 5 J/m^2 est probablement liée à une modification de la physiologie de la cellule, mais ni l'étude de la survie, ni celle du cycle cellulaire est capable de le montrer. En revanche, grâce au test *in vitro* d'excision-resynthèse nous observons que le traitement génotoxique aux doses d'UVB utilisées ($< 5 \text{ J/m}^2$) entraîne une réponse au niveau des activités de réparation. Ainsi, notre test constitue un marqueur de l'exposition génotoxique plus sensible que la survie ou l'analyse du cycle et permet la détection d'une réponse précoce par rapport aux autres systèmes de mesure.

d) Discussion des résultats sur l'effet de la confluence au moment de l'irradiation

Nous avons montré que lorsque les cellules témoins sont irradiées avec 80 J/m², les modifications au niveau du cycle cellulaire ne sont pas les mêmes suivant le niveau de confluence. De plus, la sensibilité des cellules aux UV, en terme de survie, semble moins prononcée lorsque les cellules sont irradiées à la plus forte densité (niveau 3). Il a été montré dans la littérature, que la confluence pouvait influencer sur la réponse cellulaire. Par exemple, l'irradiation UVC est moins cytotoxique lorsque les cellules XPC^{-/-} sont confluentes au moment du traitement (Carvalho *et al.*, 2003). Les fibroblastes (da Costa *et al.*, 2008) ainsi que les kératinocytes (Chaturvedi *et al.*, 1999), issus de biopsies de peau de patients sains, entrent également moins en apoptose après une irradiation UVC lorsque les cellules sont irradiées à forte densité. Cette observation est aussi valable pour la lignée CHO (Dunkern *et al.*, 2002). Ainsi, nos résultats obtenus *in vivo* (survie et cycle cellulaire) sont en accord avec la littérature.

Pour étudier l'ER, nous avons choisi de nous placer en réponse à de très faibles doses d'UVB (< 5 J/m²). A la dose de 5 J/m², nous n'observons aucun effet significatif de la confluence sur la survie et le cycle cellulaire. Dans nos conditions, la confluence peut avoir un effet sur la réponse cellulaire à l'irradiation mais celle-ci est visible uniquement lorsque nous analysons l'ER. Il faut donc être particulièrement vigilant quant à l'influence du paramètre « confluence des cellules » sur les résultats obtenus avec notre test *in vitro*. Ainsi, pour pouvoir comparer les activités d'ER de plusieurs lysats, il est indispensable de travailler à confluence équivalente pour toutes les souches. Nous avons donc rigoureusement contrôlé ce paramètre ; les résultats présentés dans cette étude ont été obtenus à partir de niveaux de confluence similaires suivant les différents phénotypes XP et normaux (niveau 1 de confluence). L'influence du paramètre « confluence des cellules » sur les activités de réparation peut expliquer la variabilité des résultats que nous avons obtenue en répétant les expériences lors de la caractérisation de phénotypes de réparation pour les différentes lignées XP en réponse au traitement UVB.

Les cellules 100 % confluentes ont un métabolisme différent des cellules peu confluentes, qui prolifèrent encore. Ainsi, la réplication de l'ADN est ralentie dans les cellules où la croissance est ralentie ou arrêtée (Dunkern *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2008). Ceci serait à l'origine de la plus grande résistance des cellules confluentes à une irradiation UV. Nous pouvons alors nous demander si la réparation de l'ADN ne serait pas influencée par la

prolifération cellulaire et donc l'activité de réplication de l'ADN. Est-ce que la stimulation des activités d'ER observée sur la puce plasmide suite à une irradiation UVB accompagne l'activité de réplication? En effet, la formation de photoproduits dans l'ADN après une irradiation UV va entraîner un arrêt temporaire de la réplication. Cet arrêt peut avoir deux conséquences : l'activation de la voie de signalisation initialisée par ATR, et l'effondrement de la fourche de réplication (collapse) à l'origine de l'apparition de cassures doubles brins dans l'ADN (da Costa *et al.*, 2008). Nous avons vu dans le chapitre I, que la signalisation déclenchée par ATR active l'expression de différents facteurs de la réparation. Cette stimulation de la voie ATR dans les cellules très peu confluentes expliquerait la stimulation des activités d'ER observée avec notre test. Il a également été montré qu'après un traitement des cellules au cisplatine, l'expression de la protéine p53 était beaucoup plus activée dans des cellules non confluentes par rapport à des cellules totalement confluentes au moment du traitement (Bar *et al.*, 2004). Ainsi, nous émettons l'hypothèse qu'en réponse à l'irradiation UVB, les voies de signalisation ATR et p53 dépendantes sont plus fortement activées dans les cellules non confluentes, ce qui permettrait la stimulation des activités de réparation pour ce niveau de confluence uniquement.

Par ailleurs, il a été montré que la lignée de kératinocyte, HaCaT, produit beaucoup plus de ROS (Reactive Oxygen Species) suite à une irradiation UVB, lorsque les cellules sont très peu confluentes au moment de l'irradiation (Kovacs *et al.*, 2009). Nous pouvons donc penser que lorsque les cellules sont au niveau 1 de confluence, l'irradiation UVB favorise un état oxydant, ce qui entraînerait la formation de lésions de l'ADN et ainsi l'activation de voies de réparation.

B. Réponse à un traitement oxydant

Nous avons observé une activation des voies de réparation suite à une exposition des cellules témoin aux UVB, l'ensemble de l'ER des lésions présentes sur la puce étant stimulée. Afin de mieux déchiffrer quelle est l'origine de cette stimulation, nous avons reconduit cette analyse en réponse à un traitement génotoxique, d'une autre nature. Nous avons choisi un traitement induisant un stress oxydant. Les lésions de l'ADN cellulaire créées par ces deux types de traitement seront différentes et la cascade de signalisation mise en place en réponse au traitement sera également différente.

Alors que l'irradiation UV génère majoritairement des photoproduits pris en charge par la NER, le traitement oxydant va générer des lésions prises en charge théoriquement par les enzymes et facteurs de la BER. La maladie du Xeroderma pigmentosum est associée à une

déficience de la NER : les patients sont incapables de réparer les photoproduits et les adduits volumineux de l'ADN. Cependant, il est de plus en plus clair, que la déficience XP est également associée à une diminution de la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN. Nous l'avons déjà évoqué à plusieurs reprises dans ce manuscrit. Ainsi, il s'agit ici d'étudier quelle est la réponse des cellules XP après un traitement oxydant en mesurant les activités d'ER sur la puce plasmide. Quelle signature de la réparation de l'ADN obtenons-nous lorsque les cellules sont traitées après un traitement oxydant ? Obtient-on des signatures différentes avec des traitements différents ?

1. Etude préliminaire

a) Mise au point du traitement oxydant

Notre premier choix pour mettre en œuvre le stress oxydant s'est tourné vers un traitement à l'H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène). Cependant, la réponse cellulaire suite à ce traitement étant très variable d'une expérience à l'autre, nous avons cherché à réaliser un autre type de traitement oxydant. Nous avons donc opté pour un traitement mettant en jeu la riboflavine. La riboflavine ou vitamine B2 a été découverte en 1932. Une carence en vitamine B2 est à l'origine de lésions cutanées et de problèmes oculaires (larmolement et opacification de la cornée). La riboflavine joue, en effet, un rôle biologique extrêmement important dans les transferts d'électrons après sa transformation en flavine mononucléotide, FMN, et flavine-adenine dinucléotide, FAD. C'est un cofacteur de nombreuses enzymes. Son rôle est donc capital dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce composé exerce son pouvoir oxydant uniquement après avoir été excité par une source de lumière visible ou UV. Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser la lumière visible pour activer la riboflavine, afin de s'affranchir de la formation de photoproduits engendrée par les UV. En effet, nous voulons étudier uniquement l'effet de la formation de lésions oxydatives dans l'ADN.

Les conditions optimales de traitement, du point de vue de la praticité de la mise en œuvre et de la reproductibilité, demandent d'ensemencer les cellules pendant 72 h avec de la riboflavine mélangée au milieu de culture et d'éclairer les cellules dans le milieu de culture pendant 5 min avec de la lumière visible.

Nous avons contrôlé que l'irradiation seule (*ie.* sans riboflavine dans le milieu), n'entraîne pas de cytotoxicité.

Comme pour la réponse aux UV, nous avons commencé par analyser la cytotoxicité du traitement oxydatif grâce au test MTT.

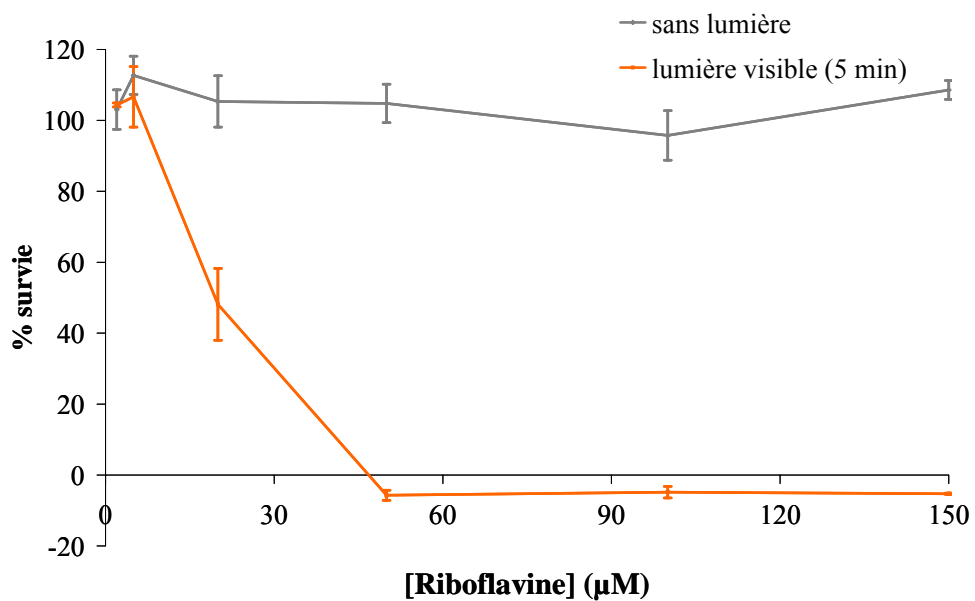


Figure 59: Courbes de cytotoxicité 24 h après un traitement à la riboflavine photo-excitée de fibroblastes témoin.

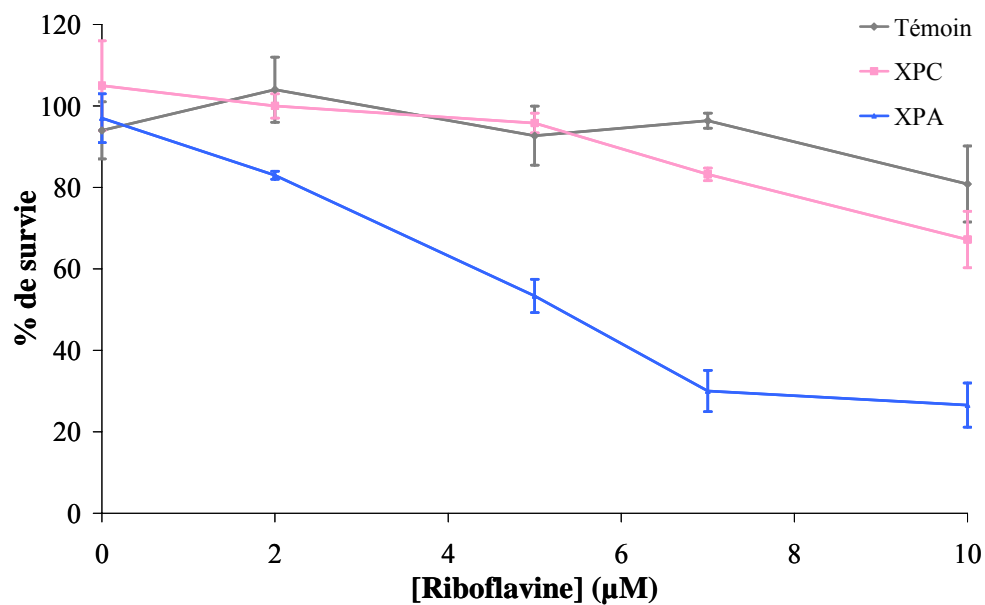


Figure 60: Courbes de cytotoxicité 24 h après un traitement à la riboflavine photo-excitée de fibroblastes témoins et XP.

b) Cytotoxicité de la riboflavine photoactivée

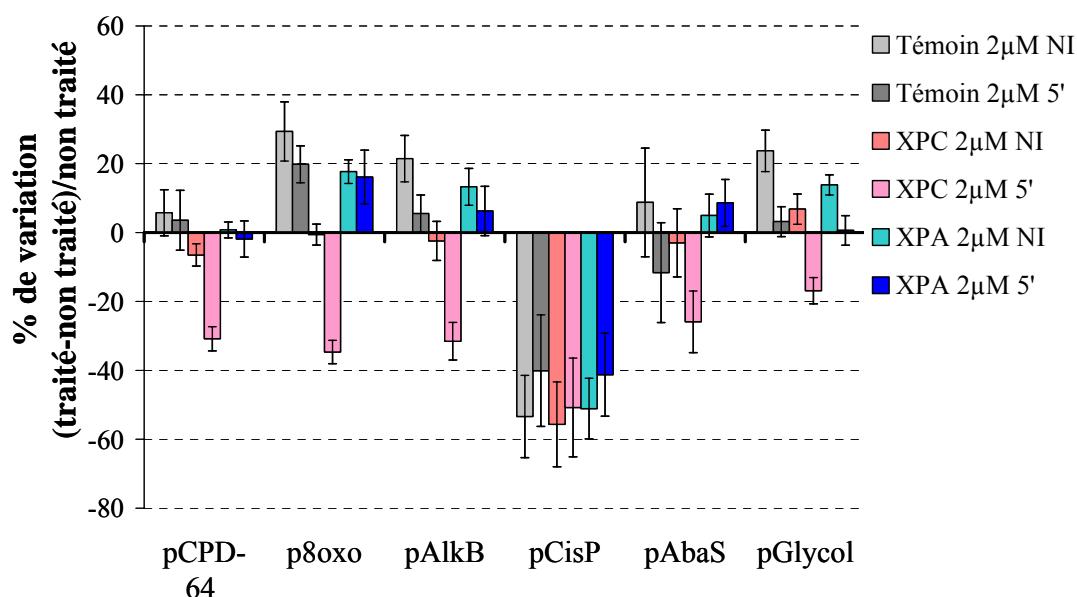
Les cellules de fibroblastes témoins ont donc été traitées pendant 72 h avec différentes concentrations de riboflavine (0 à 100 μ M). Pour chaque concentration, les cellules ont été irradiées ou non pendant 5 min avec de la lumière visible. En effet, il est important de connaître l'effet des 72 h d'incubation des cellules avec la riboflavine non photo-excitée. Un test MTT a été réalisé afin de mesurer la survie cellulaire 24 h après la photo-excitation.

La **figure 59** résulte de trois expériences indépendantes et montre l'effet cytotoxique de la riboflavine photo-excitée ou non. La riboflavine seule entraîne très peu de mortalité cellulaire même à la plus forte concentration utilisée (100 μ M). Au contraire, lorsque la riboflavine est photo-excitée, la survie cellulaire diminue en fonction de la concentration du composé. Ainsi, la cytotoxicité est due uniquement à la photo-excitation du composé, et non au composé lui-même. De plus, le traitement à la riboflavine photo-excitée donne des résultats plus reproductibles en comparaison avec ce qui était obtenu avec un traitement à l' H_2O_2 . La DL50 est obtenue pour une concentration de riboflavine photo-excitée de 20 μ M.

Comme pour la réponse aux UVB, nous souhaitons étudier l'excision-resynthèse en réponse à un traitement oxydant très peu cytotoxique. Nous allons comparer les deux types de traitement (UVB vs traitement oxydant) lorsque la cytotoxicité n'excède pas 15 %. Avec les UVB, la stimulation de la réparation est observée chez le témoin uniquement aux très faibles doses entraînant très peu de cytotoxicité. Qu'en-est-il après un traitement oxydant entraînant la même cytotoxicité ? Nous cherchons à connaître s'il existe un effet différentiel sur les activités BER et NER après un traitement oxydant en comparaison avec un traitement UV de même cytotoxicité.

La **figure 60** décrit la survie cellulaire des fibroblastes témoin et XP 24 h après le traitement à la riboflavine photo-excitée. Comme auparavant, la riboflavine seule n'entraîne pas de cytotoxicité (données non montrées). Nous observons que les cellules XPA sont nettement plus sensibles que les cellules témoin et XPC. A la concentration de riboflavine photo-excitée de 10 μ M, 75 % des fibroblastes XPA^{-/-} sont morts. Pour avoir 15 % de mortalité chez la souche la plus sensible (*ie.* XPA), il faut donc traiter les cellules avec 2 μ M de riboflavine photo-excitée pendant 5 min à la lumière visible.

A/



B/

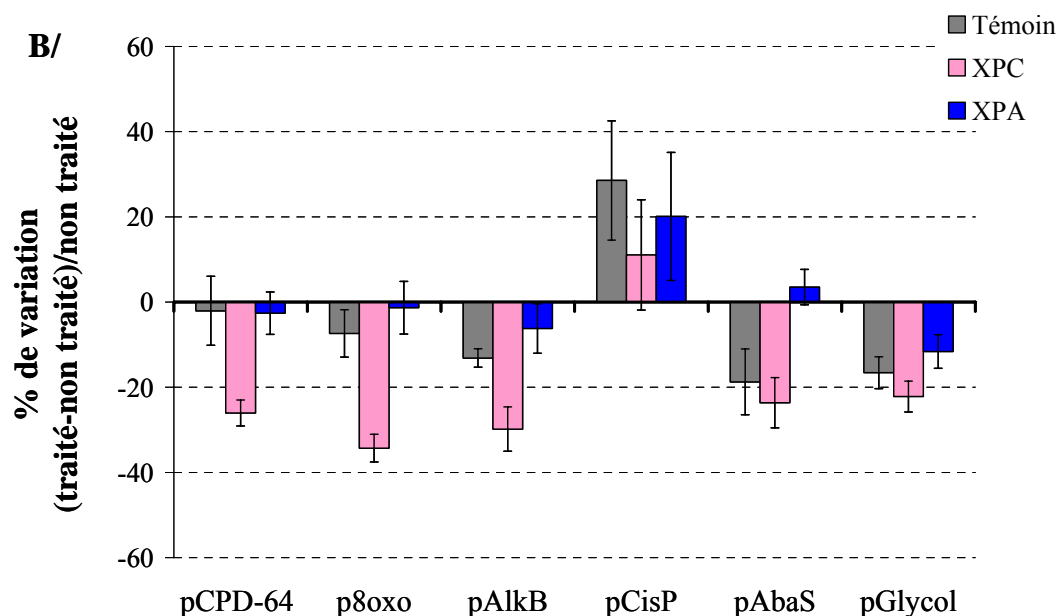


Figure 61: Réponse en termes d'activités d'excision-resynthèse de lysats nucléaires de fibroblastes 24 h après un traitement oxydant. Pour chaque lysat, l'intensité de fluorescence correspondant au lysat de cellules traitées a été exprimée suivant un pourcentage de variation par rapport à l'intensité de fluorescence du lysat de cellules non-irradiées. **A/** Pourcentage de variation par rapport au lysat de cellules incubées dans le milieu seul (0 μ M de riboflavine). NI: Non Irradié ; 5': les cellules ont été irradiées avec de la lumière visible pendant 5 min. **B/** Pourcentage de variation par rapport au lysat de cellules incubées avec 2 μ M de riboflavine non photo-excité

2. Excision-resynthèse en réponse à un traitement oxydant

La **figure 61** présente la réponse en termes d'activités d'excision-resynthèse après un traitement avec 2 μ M de riboflavine photo-excitée. Les données présentées ci-après résultent d'une seule expérience et devront donc être confirmées. Afin de connaître l'effet sur la réparation, de l'incubation des cellules avec 2 μ M de riboflavine pendant 96 h (72 h + 24 h), le pourcentage de variation de l'intensité de fluorescence a été calculé dans un premier temps par rapport au lysat de cellules non traitées (*ie.* sans riboflavine) (**Figure 61 A/**). Ainsi, nous observons que la riboflavine non photo-excitée a un effet sur les activités d'ER des lysats nucléaires témoin et XPA. En effet, l'ER de la 8-oxoG, des bases alkylées et des diols de pyrimidines est stimulée (le pourcentage de variation est positif) lorsque les cellules se sont développées avec 2 μ M de riboflavine non photo-excitée. La riboflavine est connue pour son action de co-facteur au niveau de nombreuses enzymes de la chaîne respiratoire. Son action pourrait donc avoir un effet stimulateur indirect sur la réparation des lésions oxydatives décrites ci-dessus et prises en charge par la BER. Cet effet stimulateur de la riboflavine non photo-excitée n'est pas observé dans les lysats de cellules XPC^{-/-} ce qui souligne que le déficit en cette protéine peut avoir des conséquences au niveau de la régulation cellulaire des mécanismes d'oxydo/réduction. Enfin, la riboflavine a un effet inhibiteur sur la réparation des adduits cisplatine et ceci quel que soit le lysat utilisé.

La **figure 61 B/** permet d'observer l'effet de la photo-excitation de la riboflavine, en comparant les activités d'ER obtenues pour un lysat de cellules photo-excitées par rapport à un lysat de cellules traitées par la riboflavine non photo-excitée. Nous ne nous attacherons pas à commenter l'effet du traitement oxydant sur l'ER des adduits cisplatine, puisque nous avons vu précédemment que la riboflavine seule avait un effet inhibiteur sur la réparation de cette lésion. Cet effet reste inexpliqué.

Nous pouvons constater qu'il n'y a pas d'effet de la riboflavine photo-excitée sur la réparation du lysat témoin pour les photoproduits, les bases alkylées et la 8-oxoG. Nous observons une légère inhibition de l'ER du lysat témoin pour les sites abasiques et des diols de pyrimidine en réponse au traitement oxydant. Ainsi, la réponse serait différente suite au traitement pour la réparation de ces deux lésions par rapport aux autres lésions présentes sur la puce. Cependant, ces résultats devront être confirmés.

En ce qui concerne la réponse de lysats XP suite au traitement des cellules par la riboflavine photo-excitée, nous observons des réponses différentes pour XPA et XPC. En effet, le pourcentage de variation est nul pour le lysat XPA et ceci pour toutes les lésions

présentes sur la puce. Ainsi, le traitement oxydant n'a aucun effet sur les activités de réparation de ce lysat. En revanche, ce qui concerne le lysat de cellules XPC^{-/-} le traitement entraîne une inhibition des activités d'ER et ceci pour l'ensemble des lésions. Nous observons que la réparation est particulièrement diminuée pour la lésion 8-oxoG, dommage réparé par la voie BER.

En conclusion, alors que l'irradiation UVB des cellules témoin stimule les activités d'ER du lysat nucléaire correspondant, le traitement oxydant ne stimule pas les activités de réparation du lysat témoin. Ainsi, les deux types de traitement entraînent des réponses différentes en termes d'activités d'ER à cytotoxicité identique. Nous pouvons penser que les voies de signalisation mises en place après ces deux traitements génotoxiques sont différentes. Alors que le traitement UVB stimule à la fois des activités enzymatiques de la NER mais aussi de la BER, le traitement à la riboflavine photo-excitée n'augmente aucune de ces activités. Il faut souligner, ici, la réactivité particulière des cellules XPC au traitement à la riboflavine. Alors que non photo-excitée, cette molécule stimule les activités de réparation du lysat témoin et du lysat XPA, elle n'induit aucune réponse pour les cellules XPC. De plus, un effet inhibiteur fort sur les activités d'ER des lysats XPC est observé suite à la photo-excitation ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle important de cette protéine dans la réparation des « petites » lésions prises en charge par la BER voire dans la signalisation de ces lésions permettant leur réparation.

Chapitre III

Discussion

La réparation de l'ADN est un mécanisme cellulaire complexe de par le grand nombre de protéines mises en jeu et les nombreuses interactions existantes entre les voies de réparation. La réparation est à considérer comme un réseau protéique complexe. La réparation de l'ADN est également modulée suivant la nature du dommage, le tissu cellulaire dans lequel survient le dommage, la phase du cycle au moment de l'apparition du dommage dans l'ADN. La complexité de la réparation de l'ADN est ici appréhendée au moyen de tests *in vitro* permettant la mesure précise d'activités de réparation (excision-resynthèse ou excision seule) de plusieurs lésions et ceci de façon simultanée.

Nous avons quantifié les activités d'excision-resynthèse de lignées XP, dans le but de caractériser des phénotypes de réparation de l'ADN, pour les groupes de complémentation A et C. Pour cela, nous avons travaillé à partir de deux modèles cellulaires différents : des HeLa siRNA et des lignées de fibroblastes de patients XP. Globalement, nous obtenons les mêmes résultats avec les deux modèles.

Nous avons, ainsi, mis en évidence que le niveau basal (*ie.* sans traitement génotoxique) d'ER est identique entre un lysat nucléaire témoin et un lysat nucléaire de cellules XPA lorsque la réaction est conduite en présence d'une concentration limitante en protéines (0,3 mg/mL). Nous avons également été surpris d'observer un niveau de réparation de la 8-oxoG plus fort dans un lysat XPA que dans un lysat témoin. Nous avons obtenu, en revanche, des activités d'ER plus faibles pour un lysat XPC et ceci pour les lésions prises en charge par les deux systèmes étudiés avec notre test (la voie BER et la voie NER).

Surpris de ces résultats à l'état basal, nous avons donc cherché à faire varier des paramètres expérimentaux, comme la concentration protéique et le temps de la réaction, afin de comprendre les mécanismes et les équilibres enzymatiques mis en jeu lors de la réaction d'ER. Nous constatons qu'en augmentant la concentration protéique, la balance des différents systèmes de réparation est modifiée. En effet, la réparation des lésions spécifiques de la NER (photoproduits et adduits cisplatine) est plus efficace, puisque nous observons une augmentation de la part relative de l'ER de ces lésions lorsque la réaction est conduite en présence d'une plus grande quantité de protéines. Dans ces conditions seulement, l'activité d'ER du lysat XPA est plus faible que celle du lysat témoin. Ainsi, à la concentration de 1 mg/mL, nous obtenons un niveau de réparation globale du lysat XPA équivalente à 65 % de l'activité du lysat témoin, ce qui est inférieur à ce que nous obtenons avec 0,3 mg/mL de protéines (100 %). Le niveau relatif de réparation du lysat XPA est diminué pour l'ensemble des lésions présentes sur la puce lorsque la concentration protéique augmente.

Comme pour le test de référence en France pour le diagnostic de la maladie XP (UDS), nous avons mesuré les activités d'ER en réponse à une irradiation des cellules avec des doses d'UVB n'entraînant pas plus de 15 % de cytotoxicité chez la souche la plus sensible. Le test UDS utilise généralement les UVC et est conduit à des doses (jusqu'à 15 J/m²) entraînant beaucoup plus de cytotoxicité. Nous avons fait le choix de nous limiter à l'effet sur la réparation de faibles doses. Nous avons, alors, observé une stimulation des activités de réparation pour le lysat nucléaire de cellules témoin uniquement. De plus, cette stimulation est particulièrement marquée pour les lésions prises en charge par la BER (la 8-oxoG et les sites abasiques).

Nous allons ici approfondir les avantages offerts par nos tests par rapport à ceux utilisés dans la littérature et discuter nos résultats. Pour cela, nous avons choisi de raisonner en termes d'équilibres réactionnels. Au cours de cette discussion, nous allons, notamment, tenter de répondre aux questions suivantes :

- Que se passe-t-il au niveau basal en présence de 0,3 mg/mL de protéines ? La concentration protéique est-elle limitante par rapport à la quantité de substrat ?
- Des équilibres enzymatiques différents sont-ils mis en place lorsque la réaction d'excision-resynthèse est réalisée avec plus de protéines ?
- Que se passe-t-il en réponse à une irradiation UVB ? Pourquoi les activités de réparation du lysat témoin sont-elles stimulées et pas les activités des lysats XP ?

I. Spécificités liées aux modèles cellulaires utilisés dans cette étude

Les tests *in vitro* que nous avons utilisés dans cette étude requièrent la préparation de lysats cellulaires. Les réactions conduites sur la puce plasmide s'effectuent à des concentrations comprises entre 0,3 et 1 mg/mL pour un lysat nucléaire et aux alentours de 1,5 mg/mL pour un lysat total. L'échantillon doit être suffisamment concentré à la fin de la lyse cellulaire pour être utilisé dans ces gammes de concentrations lors de la réaction sur la puce. Ces contraintes de concentrations sont particulièrement vérifiées pour les lysats nucléaires (par rapport aux lysats totaux) car il est difficile d'obtenir des échantillons très concentrés. Il est donc indispensable de préparer des lysats cellulaires à partir d'un nombre suffisant de cellules (au minimum 3x10⁶ cellules). Ainsi, nous sommes encore loin de pouvoir

travailler à partir de peu de cellules (100 000) comme c'était l'objectif en début de thèse. Cependant, nous travaillons avec des quantités raisonnables de cellules, le nombre de boîtes de culture nécessaire pour préparer les lysats étant gérable facilement. Rappelons que dans le test de référence, les lysats cellulaires sont réalisés sur environ un milliard de cellules soit 300 fois plus que dans notre cas (Wood *et al.*, 1988). La caractérisation phénotypique des lignées XP a demandé de multiples expériences sur puce et donc un grand nombre d'échantillons. Il a alors été décidé de travailler à partir de lignées cellulaires et non à partir de culture primaire.

Le modèle siRNA nous a permis d'aborder le projet dans sa phase exploratoire. Les cellules HeLa siRNA ont été conçues par le Dr. D. Biard en transfectant des cellules HeLa avec un vecteur comportant, notamment, une séquence codant pour un siRNA spécifique de l'ARNm du gène à éteindre (dans notre cas, *XPA* et *XPC*). Il s'agit d'un mécanisme post-transcriptionnel de régulation des gènes, hautement coordonné et séquence spécifique. Cet outil permet l'obtention de cellules cultivables à l'infini (HeLa) dont la déficience pour une protéine spécifique de la réparation (siRNA) est également très stable dans le temps. Comme nous l'avons vu, l'ER de la lignée déficiente pour XPC est moins efficace que l'ER du lysat témoin et ceci pour les lésions prises en charge par la BER mais pas pour celles prises en charge par la NER. Les lignées de fibroblastes XPC sont, elles, déficientes pour la réparation des photoproduits et des adduits cisplatine en plus de dommages pris en charge par la BER. De plus, il est à noter des différences de survie cellulaire après une irradiation UVB entre le modèle siRNA et les lignées de fibroblastes. En effet, les cellules HeLa siRNA XPA sont 5 fois moins sensibles que leurs homologues fibroblastes.

Les différences observées entre les deux modèles peuvent avoir deux origines. La première est vraisemblablement due aux différences génotypiques de ces deux modèles. En effet, il ne faut pas oublier que la lignée HeLa provient d'un cancer de l'utérus d'origine viral (Papilloma virus HPV 18). Or, l'intégration du virus HPV 18 dans le génome humain entraîne la dégradation de la protéine p53 par la protéine E6 de HPV18 (Mantovani *et al.*, 2001) et l'inhibition du rétinoblastome (pRB), jouant également le rôle de suppresseur de tumeur par la protéine E7 de HPV18 (Munger *et al.*, 2001). Ainsi, les cellules HeLa sont susceptibles de présenter de multiples mutations génomiques du fait de l'inhibition des suppresseurs de tumeur. Les cellules HeLa présentent, également, de nombreuses aberrations chromosomiques : quatre copies du chromosome 12, trois copies des chromosomes 6, 8 et 17. Nous pouvons penser que ces mutations génomiques et ses anomalies chromosomiques ne sont pas sans conséquence sur les activités de réparation observées dans ces cellules.

Les différences de sensibilité aux UV observées entre les deux modèles peuvent être attribuées, également, aux patrimoines génétiques différents entre les HeLa siRNA et les fibroblastes de patients XP.

Ainsi, le modèle siRNA ne peut refléter complètement la réalité du phénotype XP, il ne fait que le modéliser. Néanmoins, les phénotypes obtenus à partir des cellules HeLa siRNA, nous ont permis de constater qu'il est impossible de discriminer les phénotypes XP au niveau basal avec une quantité limitante de protéines.

Pour approfondir notre étude sur la caractérisation des phénotypes de réparation XP, nous avons donc opté pour l'utilisation de lignées de fibroblastes issus de patients diagnostiqués XP (IGR et Coriell). Les fibroblastes sont mis en culture à partir de biopsies de peau et sont transformés par un vecteur viral SV40 pour les rendre immortels. Ce modèle cellulaire nous a permis d'obtenir un grand nombre de cellules facilement cultivables et d'établir des phénotypes de réparation de l'ADN pour plusieurs groupes de complémentation (A, C, D et G). SV40 (Simian virus 40) est un virus à ADN de la famille des papovavirus (Ludlow 1993). Utilisé au départ pour fabriquer le vaccin anti-poliomyélite, le caractère oncogénique de SV40 repose sur deux antigènes, nommés « Large T » et « Small t », et a été utilisé par la suite pour immortaliser les cellules en culture. Cependant, la transformation par SV40 n'est pas anodine pour la cellule et entraîne des modifications au niveau de la réponse cellulaire notamment face à un traitement génotoxique. Ainsi, le rôle de p53 peut être discuté dans les cellules transformées.

Nous avons vu dans l'introduction, le rôle primordial de cette protéine dans la signalisation de la réparation. Qu'en est-il dans les cellules transformées ? La transformation par SV40 modifie la fixation de p53 sur la matrice nucléaire après un traitement génotoxique. En effet, il se forme moins de complexe ADN-p53 dans les cellules transformées que dans les cultures primaires (Jiang *et al.*, 2001). Le virus SV40 produit l'antigène LT (Large T Antigen) ; celui-ci interagit avec la protéine p53 ainsi qu'avec la protéine du rétinoblastome pRB (Ludlow 1993). Cette interaction entre les deux protéines inhibe la fonction de p53. Nous pouvons, alors, émettre l'hypothèse que p53 ne peut exercer pleinement son rôle lors de la réponse cellulaire face à un traitement génotoxique laissant présager une influence sur la mise en place de la réparation dans les cellules transformées. Par exemple, il a été démontré que le niveau de réparation des CPDs est diminué dans les cellules transformées par SV40 (Bowman *et al.*, 2000). Cette diminution de l'efficacité n'affecte pas les 6-4 PPes et a été

attribué directement à l'inhibition de la fonction de p53 par l'interaction avec l'antigène LT du virus SV-40. Cependant, toutes les protéines p53 ne sont pas séquestrées, une fraction reste libre dans la cellule et donc potentiellement fonctionnelle (Hess *et al.*, 1997b; Kohli *et al.*, 1999). Ainsi, nous pouvons penser que les voies de signalisation dépendantes de p53 pourront se mettre en place, partiellement, dans les cellules transformées par SV40. Enfin, du fait du statut modifié pour p53 des cellules transformées SV40, nous pouvons nous attendre à un comportement différent vis-à-vis du cycle cellulaire et de l'apoptose en réponse à un traitement génotoxique par rapport à des cellules en culture primaire. Il a été montré, en effet, que des cellules transformées par SV40, ne s'arrêtent pas en G1 suite à une irradiation gamma comme le font des cellules en culture primaire et sont plus susceptibles de mourir par apoptose (Kohli *et al.*, 1999).

La transformation virale des fibroblastes, dans le but de créer des lignées immortelles, porte également conséquence sur l'activité de certaines enzymes du cycle du glutathion (Bravard *et al.*, 1993). Par exemple, les activités de la glutathion peroxydase (GPX), de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase sont diminuées (Bravard *et al.*, 1993; Hoffschir *et al.*, 1993). Les cellules transformées utilisées dans cette étude présenteraient donc un état pro-oxydant favorable. Cela suggère qu'il se forme plus de lésions oxydatives dans ces cellules par rapport à des cultures primaires. De ce fait, les conséquences au niveau de la réparation de l'ADN ne peuvent être négligées. Il faut rajouter que l'activité catalase est également diminuée dans les cellules déficientes XP par rapport à des cellules normales (Hoffschir *et al.*, 1998). Cette baisse de l'activité catalase dans les cellules XP et dans les cellules transformées par SV40 est associée à une augmentation de l'activité transaldolase (Lachaise *et al.*, 2001). La transaldolase régule la quantité de NADPH, cofacteur notamment de la catalase et de la SOD dans la cellule. Ainsi, nous pouvons nous attendre à un état fortement pro-oxydant dans les lignées XP étudiées ici, modifiant sûrement ainsi artificiellement les activités d'excision-resynthèse ou d'excision seule mesurées.

Les phénotypes obtenus dans cette étude pour les fibroblastes XP devront donc être confirmés à partir de cultures primaires.

II. Interaction entre les systèmes de réparation BER et NER

La principale particularité de nos tests est la quantification conjointe d'activités de réparation de plusieurs lésions de l'ADN à partir d'un même lysat cellulaire. En réglant le gain, de façon à quantifier une intensité de fluorescence pour tous les plasmides ou oligonucléotides présents sur la puce, nous arrivons ainsi à mesurer l'excision-resynthèse ou

l'excision seule pour toutes les lésions étudiées. Nos tests de mesure de la réparation sont très sensibles : nous obtenons très peu de bruit de fond et nous arrivons à mesurer des activités de réparation avec une faible quantité de protéines par rapport à ce qui est classiquement décrit dans la littérature.

Nous sommes capables de mesurer l'excision-resynthèse de lésions prises en charge par la voie BER et d'autres pas la voie NER au cours de la réaction sur la puce plasmide. Notre test permet donc d'avoir une approche beaucoup plus globale de la réparation que ce qui est réalisé avec les tests existants où la réparation n'est jamais étudiée sur plus d'une lésion à la fois.

Cependant, l'organisme vivant n'est jamais confronté à un seul type de dommage. Il doit constamment répondre à une multitude d'agressions génotoxiques entraînant donc en permanence de multiples lésions du génome. De plus, une même source génotoxique ne conduit pas à un type de lésion. Par exemple, le rayonnement ultraviolet conduit à la formation de dimères de pyrimidine (un mélange de 6-4 PPs et de CPDs) mais aussi à des bases oxydées comme la 8-oxoG (Courdavault *et al.*, 2004a). Des phénomènes de compétition au niveau des systèmes de réparation entrent alors en jeu. Ainsi, notre test *in vitro* permet d'appréhender ces phénomènes de compétition et apporte donc de nouvelles informations par rapport aux données de la littérature.

Comme nous l'avons vu dans la partie expérimentale, le lysat XPC présente une activité basale (*ie.* sans traitement génotoxique au préalable des cellules) d'ER plus faible que celle obtenue pour le lysat témoin. Cette baisse d'activité est observée pour toutes les lésions présentes sur la puce plasmide avec un lysat de fibroblastes XPC^{-/-}. Le lysat nucléaire XPC présente donc une certaine déficience pour la réparation de lésions prises en charge par la NER mais aussi par la BER. Ces résultats ont été validés à partir de deux souches de fibroblastes déficients pour la protéine XPC.

D'un côté, la baisse globale (pour toutes les lésions) des activités de réparation serait en faveur d'un rôle régulateur de la protéine XPC. Le facteur XPC exercerait un rôle général dans la réparation ce qui expliquerait que l'absence de la protéine affecte l'excision-resynthèse de l'ensemble des lésions. D'un autre côté, les résultats obtenus avec la puce plasmide soulignent l'existence de relations transversales entre les systèmes de réparation. Ceci confirme de nombreuses expériences de la littérature (Reardon *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 2003; D'Errico *et al.*, 2006; Bernardes de Jesus *et al.*, 2008). L'implication des protéines XP et notamment de XPC dans la réparation des dommages oxydatifs a été décrite pour la

première fois en 1997. Les travaux de Reardon *et al.* portent sur la mesure de l'excision de dommages oxydatifs tels que la 8-oxoG et les diols de thymine contenus dans des duplexes oligonucléotides d'environ 140 pb. Lorsque les ODN sont incubés en présence des 6 facteurs de la NER (XPC/hHR23B, XPA, RPA, XPB, XPD, XPG et XPF/ERCC1), ils observent une coupure spécifique de l'ODN comportant la lésion. Cette découverte a alors remis en cause la vision classique de la réparation à savoir son organisation verticale où un type de lésion est pris en charge par une voie de réparation spécifique. Reardon *et al.* montrent l'implication des protéines de la NER dans l'excision des dommages oxydatifs, normalement pris en charge par la BER. Dans notre cas, nous observons que l'excision-resynthèse du lysat XPC est plus faible pour ce type de lésion que celle du lysat témoin. Nos résultats suggèrent donc que l'excision seule peut être à l'origine de ce niveau plus faible mais nous ne pouvons pas exclure que le lysat XPC présente aussi un défaut lors de la resynthèse.

Les mécanismes de réparation ne peuvent être vus comme des systèmes cloisonnés, au contraire il existe de nombreuses interactions entre les différentes voies pour limiter au maximum l'accumulation de lésions dans l'ADN. La puce plasmide, de par son approche globale permet d'appréhender ces phénomènes d'interaction régissant la réparation et de considérer la réparation comme un réseau enzymatique dynamique et complexe.

Si la protéine XPC est impliquée dans la réparation des dommages oxydatifs, nous nous attendions donc à observer une activité d'excision sur la puce oligo plus faible pour le lysat de cellules XPC^{-/-} par rapport à l'activité du lysat témoin. Or, nous n'observons aucune différence entre l'activité du lysat témoin et celle du lysat XPC. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ce résultat.

Tout d'abord, la concentration protéique du lysat lors de la réaction d'excision sur la puce oligo est bien plus faible que lors de la réaction d'excision-resynthèse sur la puce plasmide. Les ODN étant très vulnérables à l'attaque des nucléases, lorsque la concentration protéique du lysat cellulaire augmente, nous observons une augmentation des coupures aspécifiques des oligos présents sur la puce. Il n'est donc pas possible de travailler avec des concentrations protéiques supérieures à 20 µg/mL. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse qu'à cette concentration protéique, les équilibres enzymatiques ne sont pas en faveur d'une implication de la protéine XPC dans la voie BER. Nous allons voir par la suite, l'importance de la concentration protéique sur les équilibres réactionnels lors de la mesure d'activités de réparation *in vitro*.

La deuxième hypothèse concerne le support, lui même, de la réaction. En effet, la puce oligo, de par la taille et la conformation linéaire des ODN, formant le support de la réaction, fait appel à des réactions vraisemblablement beaucoup plus simples par rapport à ce qui est mis en jeu lors de la réaction sur la puce plasmide. Ainsi, nous pouvons penser que la réaction d'excision sur la puce oligo ne fait pas intervenir le facteur XPC de la NER de par l'encombrement stérique, dû à la grande taille de cette protéine (125 kDa). Il a été démontré l'existence d'une longueur minimale de l'ODN pour que la réaction d'excision impliquant les protéines de la NER puisse avoir lieu (Huang *et al.*, 1994b). Ainsi, l'ODN doit avoir une longueur minimale d'environ 100 pb avec un minimum de 60 nucléotides en 5' de la lésion et un minimum de 44 pb en 3' de la lésion. Dans notre cas, l'ODN a une taille d'environ 40 pb et la lésion est située 31 à 34 nucléotides en 3'. Cette taille est suffisante pour les ADN *N*-glycosylases de la BER, dont le poids moléculaire n'excède pas 50 kDa (Fortini *et al.*, 2003a; Hegde *et al.*, 2008), mais elle est vraisemblablement insuffisante pour que toute la machinerie de la NER puisse se mettre en place au niveau de ces lésions. De plus, la conformation linéaire de l'ODN ne constitue vraisemblablement pas le substrat idéal pour les activités NER. *In vivo*, l'ADN a une structure bien plus complexe qu'un ODN : l'organisation chromatinienne de l'ADN avec l'arrangement des histones le long de la double hélice a un impact sur le recrutement et la mise en place des différents facteurs de la NER au niveau de la lésion (Lydall *et al.*, 2005).

Nous avons analysé la réponse en termes d'activités d'ER suite à deux types de traitement génotoxique : une irradiation UVB et un traitement générant des dommages oxydatifs. Nous avons observé des réponses différentes suivant le type de stress. La réponse à l'irradiation UVB sera discutée ultérieurement.

Nous avons observé qu'un traitement à la riboflavine photo-excitée, entraînant une cytotoxicité inférieure ou égale à 15 % quelle que soit la souche considérée (témoin, XPA ou XPC) ne conduit pas à une stimulation des activités de réparation sur la puce plasmide contrairement à ce que nous observons après une irradiation UVB pour une cytotoxicité équivalente. En effet, nous observons que le traitement oxydant des cellules, ne modifie pas l'activité d'ER des lysats témoin et XPA : le niveau d'ER est le même avec ou sans traitement. Ainsi, le traitement oxydant, dans les conditions où nous l'avons effectué, ne conduit pas à la mise en place d'une réponse mesurable avec notre test. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le traitement, réalisé dans nos conditions expérimentales, ne génère pas une quantité suffisante de dommages, ou que leur nature ne permet pas d'activer une réponse

cellulaire, se traduisant par une stimulation des activités de réparation sur la puce. Ce n'est pas parce que la cytotoxicité des deux traitements est la même, qu'ils conduiront à la même quantité de dommages de l'ADN, ni à la même nature des dommages. De plus, la mort cellulaire n'est pas forcément reliée aux dommages de l'ADN. Elle peut avoir d'autres origines comme par exemple la dégradation de la membrane plasmique ou des protéines suite au traitement.

La signalisation mise en place après un traitement oxydant passerait par les protéines p53 (Seo *et al.*, 2004) et PARP1 (Schreiber *et al.*, 2006). PARP1 reconnaît les cassures de l'ADN pouvant survenir, notamment après un traitement oxydant. Cependant, dans notre cas, le traitement à la riboflavine excitée conduit uniquement à des oxydations de bases. Ainsi, la voie de signalisation passerait préférentiellement par p53. Dans le cas d'une irradiation UV, la présence de photoproduits dans l'ADN est détectée par ATR ce qui va ensuite conduire à toute une chaîne d'activation. Dans le cas des lésions oxydatives, nous pouvons penser que les lésions sont moins facilement détectées par les systèmes de surveillance. Il a notamment été montré qu'une irradiation UVA, générant entre autre des bases oxydées, conduit à une plus faible activation de la voie de signalisation dépendante de p53 que ce qui se passe après une irradiation UVB (Kappes *et al.*, 2006).

Enfin, il se peut que les enzymes présentes dans la cellule au moment du traitement à la riboflavine suffisent pour réparer les dommages occasionnés. Il n'y aurait alors pas de néo-synthèse des protéines de la réparation suite au traitement ce qui permettrait d'expliquer pourquoi nous n'observons pas de stimulation des activités de réparation sur la puce par rapport au lysat de cellules traitées par la riboflavine non photo-excitée.

Par ailleurs, nous avons montré que l'activité d'ER du lysat de cellules XPC traitées par la riboflavine photo-excitée est plus faible que celle du lysat de cellules XPC traitées par la riboflavine non photo-excitée. Ce résultat confirme l'implication de cette protéine dans la réparation des dommages oxydatifs, puisqu'une déficience pour la protéine XPC inhibe la réparation suite à un traitement oxydant. *In vivo*, il a été montré que des cellules déficientes pour la protéine XPC présentent une diminution de l'HCR lorsque les cellules ont été transfectées avec un vecteur traité au bleu de méthylène activé avec de la lumière visible (Kassam *et al.*, 2007). Le traitement effectué au bleu de méthylène activé par la lumière visible est un traitement équivalent à celui que nous avons réalisé pour étudier la réponse à un traitement oxydant. Ainsi, nous pouvons penser que dans notre cas, les fibroblastes XPC^{-/-} réparent moins que les cellules témoin et XPA ou ne réparent pas les dommages induits par le

traitement à la riboflavine excitée. Cette déficience de la réparation se traduit ensuite sur la puce par une diminution de l'activité de réparation. La déficience pour cette protéine est encore plus marquée suite à un traitement oxydant qu'à l'état basal.

Nous avons observé que le niveau d'excision des diols de thymine était plus faible pour le lysat XPA que pour le lysat témoin, lorsque nous nous intéressons uniquement à l'excision (puce oligo). Cette baisse d'activité de l'excision avec le lysat XPA n'est observée que pour cette lésion. Ce résultat a été obtenu pour deux souches différentes (XP12ROSV et GM04312), où les mutations dans le gène *XPA* ne sont pas les mêmes. Dans les deux cas, nous obtenons une activité d'excision d'environ 55 % pour le lysat XPA par rapport au lysat témoin. Ainsi, nous pouvons conclure que la protéine XPA joue un rôle au niveau de l'excision des diols de thymine. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, ce type de lésions est pris en charge par la BER. Deux types de glycosylases, NTH1 et NEIL1, permettent l'incision de cette lésion. Les spécificités d'action ne sont pas les mêmes pour ces deux enzymes. En effet, l'enzyme NEIL1 semble agir préférentiellement au niveau de structures simples brins, comme c'est le cas lors de la réplication ou de la transcription de l'ADN. De plus, NEIL1 et NTH1 sont des glycosylases bifonctionnelles, donc en théorie l'excision du dommage ne fait pas intervenir APE1. Aucune interaction entre XPA et ces deux glycosylases n'est connue à ce jour. Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse aux vues de nos résultats, que la protéine XPA joue un rôle dans l'incision de ce dommage : est-ce une stimulation de l'activité des glycosylases, comme c'est le cas avec XPC au niveau de OGG1 (Bernardes de Jesus *et al.*, 2008)? Par ailleurs, nous n'avons pas noté de différence de niveau d'ER avec un lysat XPA par rapport au témoin pour les diols de pyrimidine sur la puce plasmide. Lorsque nous mesurons à la fois l'excision et la resynthèse de cette lésion, nous ne voyons aucune différence d'activités entre un lysat XPA et un lysat témoin. Deux hypothèses permettent d'expliquer cette différence. La première serait que d'autres protéines interviennent lors du test sur la puce plasmide qui ne peuvent intervenir lors du test d'excision sur la puce oligo. La deuxième hypothèse concerne l'étape de resynthèse qui serait dérégulée dans un lysat XPA. Nous pouvons penser que si le lysat XPA présente bien un défaut dans l'excision des diols de pyrimidine, ce défaut pourrait être masqué par une incorporation d'un trop grand nombre de nucléotides lors de la resynthèse. Nous avons vu dans le chapitre I, que XPA interagit avec de nombreux facteurs de la NER, notamment avec RPA. RPA est une protéine clé de la NER et sert de socle aux polymérases lors de la resynthèse. Ainsi, nous

émettons l'hypothèse que XPA pourrait jouer un rôle lors de l'étape de resynthèse, par l'intermédiaire de RPA.

Enfin, nous avons observé une activité d'excision-resynthèse de la 8-oxoG avec un lysat XPA plus forte qu'avec un lysat témoin lorsque la réaction est conduite en présence de concentrations protéiques limitantes. Nous avons observé cette forte activité d'ER de la 8-oxoG pour des lysats obtenus à partir de deux souches XPA différentes (XP12ROSV et GM04312). Cette activité supérieure a été vérifiée au cours de nombreuses expériences et a suscité beaucoup d'interrogations. Néanmoins, il a déjà été montré qu'un lysat total de cellules XPD^{-/-} a un niveau de réparation de la 8-oxoG deux fois plus élevé qu'un lysat de cellules témoin (Jaiswal *et al.*, 1998). Les auteurs attribueraient ce niveau de réparation à un mécanisme différent de la NER.

Des résultats contradictoires sont obtenus dans la littérature en ce qui concerne la possible implication de la protéine XPA dans la réparation de la 8-oxoG. En effet, il a été montré que la réplication d'un plasmide portant une 8-oxoG est inhibée dans les cellules déficientes pour XPA alors que le plasmide est répliqué dans les cellules témoin (Klein *et al.*, 1992). Une étude sur le polymorphisme du gène *XPA* a montré que l'allèle A de ce gène est associé à une augmentation de l'activité de OGG1, glycosylase coupant la 8-oxoG (Dusinska *et al.*, 2006). Ainsi XPA serait impliquée dans la réparation de la 8-oxoG. Pourtant une autre étude, *in vivo*, a montré que le niveau de HCR d'un plasmide traité par du bleu de méthylène photo-activé sous une lampe, est identique dans les cellules XPA et les cellules témoin (Runger *et al.*, 1995). Ainsi, il se peut que XPA joue un rôle dans la réparation de la 8-oxoG mais son rôle n'est à ce jour pas clairement défini.

Dans notre cas, il peut être suggéré que dans les cellules XPA, l'activité de OGG1 soit stimulée pour faire face à l'état pro-oxydant de ces cellules. En effet, les cellules XP ont des activités enzymatiques anti-oxydantes plus faibles que les cellules témoin (catalase, superoxyde dismutase) (Hoffschir *et al.*, 1998). Suite à un stress physique de la membrane en insérant un microcapillaire dans la membrane plasmique des cellules, il a été montré que les cellules XPA produisent plus d'ERO que les cellules témoin (Arbault *et al.*, 2004). Il peut être ainsi suggéré que la souche XP12ROSV, utilisée pour nos expériences, est soumise à un état pro-oxydant plus fort que les autres souches. Cela permettrait d'expliquer pourquoi nous obtenons un niveau de réparation élevé sur la puce plasmide pour la 8-oxoG avec le lysat XPA.

Nous avons, aussi, observé que lorsque la concentration protéique augmente, le niveau relatif (*ie.* par rapport au lysat témoin) de réparation du lysat XPA diminue. Ainsi, à la plus forte concentration protéique testée, l'ER de la 8-oxoG est plus faible dans un lysat XPA que dans un lysat témoin. Nous avons vu aussi, que la réparation de cette lésion était plus efficace dans un lysat témoin lorsque la réaction est menée en présence d'une concentration plus forte de protéines. Ainsi, cela suggère que la réparation de cette lésion à faible concentration est peu efficace dans un lysat témoin. A forte concentration protéique, nous pouvons penser que la quantité de protéine XPA dans le lysat témoin est plus importante lors de la réaction, ce qui permettrait de mettre en évidence l'effet d'une déficience pour cette protéine : le lysat nucléaire XPA répare alors moins bien cette lésion. L'implication de XPA dans la réparation des dommages oxydatifs ne serait donc mesurable, sur la puce, qu'en présence d'une forte concentration protéique, ce qui n'est pas le cas pour un lysat XPC, où la déficience pour la réparation de ce type de dommages est quantifiable dès les plus faibles concentrations protéiques.

Pour conclure sur cette partie traitant des relations entre les deux voies de réparation par excision-resynthèse (NER et BER), nous confirmons les données de la littérature à savoir que les protéines XP sont impliquées dans la réparation des lésions prises en charge par la BER. Cependant, le rôle de XPC dans la voie BER semble plus important que celui de XPA. En effet, au vu de nos résultats, le lysat XPC présente une déficience pour l'ensemble des dommages réparés par la BER (8-oxoG, bases alkylées, diols de pyrimidine) alors que le lysat XPA présente une déficience uniquement pour la réparation des diols de thymine. Cette différence d'implication de ces deux facteurs XP dans la BER, est confirmée par une étude chez la Souris (Melis *et al.*, 2008) où il a été montré que les souris XPC^{-/-} développent préférentiellement des cancers du poumon ce qui n'est pas le cas des souris témoin et des souris XPA^{-/-}. Parallèlement, il a été montré la corrélation entre une accumulation de dommages oxydatifs non réparés et l'apparition d'un cancer du poumon (Paz-Elizur *et al.*, 2008). Ainsi, la protéine XPC, en étant indispensable à la réparation des dommages oxydatifs, empêche l'accumulation de tels dommages notamment au niveau du poumon et prévient de l'apparition de cancer.

III. Le niveau basal d'excision-resynthèse

Le niveau basal obtenu pour le lysat de cellules XPA^{-/-} ne nous a pas permis de caractériser un phénotype différent du lysat témoin lorsque la réaction est conduite en présence de 0,3 mg/mL. Nous observons, en effet, pour les deux modèles cellulaires une activité d'ER du lysat XPA identique à celle du lysat témoin pour les photoproduits, les adduits cisplatine, les bases alkylées et les sites abasiques. Dans la littérature, les activités de réparation correspondant au groupe de complémentation A sont bien plus faibles que celles obtenues dans cette étude. Ainsi, *in vivo*, le test HCR réalisé avec trois souches différentes de cellules XPA montre une activité de réparation d'un plasmide irradié aux UV (9 photoproduits par plasmide) de ces cellules comprise entre 5,6 et 12,1 % de l'activité de cellules témoin (Athas *et al.*, 1991). Le niveau obtenu avec le test UDS, en réponse à une irradiation des cellules à des doses UVC comprises entre 10 et 15 J/m², est également plus faible que celui que nous obtenons puisqu'il se situe entre 2 et 5 % (Cleaver 2005). En utilisant, des tests *in vitro*, les niveaux de réparation sont également plus faibles que ceux que nous obtenons mais il est à noter une plus grande variabilité des résultats présentés dans la littérature que pour les tests *in vivo*. Ainsi, Wood *et al.*, notent une variabilité de la réparation d'un facteur 2 entre trois préparations de lysat totaux de cellules normales (Wood *et al.*, 1988). Nous avons également observé une grande variabilité au sein de nos résultats en particulier pour le lysat XPA. En effet, nous avons obtenu des niveaux de réparation différents pour ce lysat d'une expérience à l'autre alors que les résultats étaient beaucoup plus constants pour le lysat XPC.

Les niveaux de réparation obtenus *in vitro* avec un lysat XPA divergent d'un article à l'autre. En effet, nous observons que suivant la quantité de protéines par rapport à la quantité de dommages (ratio quantité de protéines/ quantité de lésions), les niveaux de réparation obtenus pour le lysat XPA varient beaucoup. Ainsi, les travaux de Masutani *et al.* ont montré qu'un extrait total XPA a une activité de réparation des photoproduits de 10 % par rapport à un lysat témoin lorsque la réaction est conduite avec un ratio quantité de protéine / quantité d'ADN de 270, et un ratio quantité de protéine / quantité de lésions de 20 (Masutani *et al.*, 1993). En revanche, d'autres travaux, conduits par Jones *et al.*, ont montré que le niveau de réparation du lysat XPA atteint 67 % de celui du témoin, lorsque la réaction est conduite en présence d'un ratio quantité de protéine / quantité d'ADN de 200, et d'un ratio quantité de protéine / quantité de lésions d'environ 5, c'est-à-dire lorsque la réaction est conduite avec moins de

protéines par rapport au précédent article (Jones *et al.*, 1992). Par contre, les mêmes auteurs observent que lorsque la quantité de protéines est multipliée par trois (de 50 à 150 µg), l'activité de réparation du lysat XPA reste la même, alors que l'activité du lysat témoin augmente. Ainsi, lorsque le test de référence est conduit avec 3 fois plus de protéines, le niveau relatif de réparation du lysat XPA est alors d'environ 45 % de celui du lysat témoin. Ces résultats concordent avec ceux que nous avons obtenus. En effet, alors que le niveau d'ER du lysat XPA à la concentration de 0,3 mg/mL est la même que celle obtenue pour le lysat témoin, nous observons néanmoins que le niveau chute lorsque la réaction est réalisée avec plus de protéines. Ainsi, avec 1 mg/mL de protéines, nous obtenons un niveau global de réparation de 65 % alors que lorsque la réaction est conduite avec 3 fois moins de protéines, le niveau est de 100 %. Ainsi, nous observons que suivant la quantité de protéines par rapport à la quantité de lésions, les niveaux d'activité fluctuent. Par exemple pour le cisplatine, à la plus forte concentration protéique (1 mg/mL), le niveau obtenu avec le lysat XPA pour les adduits cisplatine est de l'ordre de 37 % alors que ce niveau est d'environ 100 % lorsque la réaction est conduite avec 3 fois moins de protéines pour la même quantité d'ADN et de lésions. Nous pouvons nous attendre à ce que le niveau diminue encore si nous continuons d'augmenter le ratio protéine / quantité de lésions. Nos résultats soulèvent donc la question de l'effet de la concentration protéique lors de tests de mesure d'activités de réparation *in vitro*.

Dans notre cas, à 0,3 mg/mL, nous pouvons penser que la quantité de protéine XPA est limitante dans le mélange réactionnel d'ER, les activités de la voie NER seraient donc réduites au minimum ou régulées différemment. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, il a été décrit l'existence de voies alternatives de la réparation. Il peut être suggéré qu'à faible concentration protéique, ces voies alternatives dominent les activités de la NER, ce qui expliquerait pourquoi il n'y aurait pas de différence d'activité entre un lysat XPA et un lysat témoin. Ainsi à cette concentration, les résultats font penser que les activités enzymatiques présentes dans un lysat de cellules XPA sont suffisantes pour réparer les lésions endogènes. Par contre, après une induction de dommages dans l'ADN (par exemple après une irradiation UV), les cellules XPA ne sont pas capables de mettre en place une réponse adaptée, du fait de la déficience pour cette protéine.

Ce niveau obtenu au niveau basal à faible concentration protéique est à prendre en considération. En effet, il apporte de nouvelles informations sur les équilibres enzymatiques mis en jeu à cette concentration. Rien ne montre qu'*in vivo*, la réparation ait lieu en présence d'une forte concentration protéique des facteurs de la réparation. Les résultats obtenus *in vitro* avec le test de référence seraient peut-être biaisés, du fait des concentrations protéiques

élevées utilisées. Les résultats obtenus au niveau basal à faible concentration montrent que le niveau de réparation de lysats nucléaires XP n'est pas nul. Cependant, nous ne savons pas si la réparation observée dans ces lysats est fidèle (*ie.* la séquence d'ADN est identique à la séquence avant l'apparition de la lésion)

Lorsque la concentration protéique augmente, nous avons montré que les équilibres enzymatiques changent, la balance entre les différents systèmes de réparation semble modifiée. En effet, la voie NER serait favorisée lorsque la réaction est conduite en présence d'une plus grande quantité de protéines. La protéine XPA est capable de former un homodimère et il a été montré que la formation de cet homodimère est favorisée, lorsque la concentration de la protéine XPA augmente (Liu *et al.*, 2005). Il a aussi été montré que le dimère XPA a une meilleure affinité que le monomère pour un adduit formé par le NA-AAF. Lorsque la réaction d'ER est conduite à plus forte concentration protéique ($> 0,3$ mg/mL), la protéine XPA se fixerait donc au niveau de l'ADN endommagé préférentiellement sous la forme de dimère. La fixation de XPA serait plus efficace, ce qui conduirait donc à une augmentation des activités de réparation du lysat témoin. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi nous discriminons le phénotype de réparation du lysat XPA du lysat témoin uniquement à forte concentration protéique.

L'étude de la concentration protéique nous a montré un effet différent pour les deux types de lysats testés (XPA et XPC). L'effet de l'augmentation de la concentration est beaucoup plus marqué sur un lysat XPA qu'un lysat XPC. De plus, l'effet est visible sur toutes les lésions présentes sur la puce hormis les diols de pyrimidine. Pour le lysat XPC, seule la réparation relative des photoproduits, des adduits cisplatine et de la 8-oxoG diminue sous l'effet de concentrations protéiques croissantes. Ainsi, ce résultat souligne les rôles différents joués par ces deux protéines. XPC aurait un rôle « ubiquitaire » dans la réparation, ce facteur agirait aussi bien au niveau de la NER que de la BER. Le rôle de XPA semble répondre à une régulation plus fine. Nous avons montré dans le chapitre I, le rôle polyvalent de XPA dans la NER, cette protéine agissant au niveau de plusieurs étapes, de la reconnaissance du dommage jusqu'à la resynthèse par l'intermédiaire de son interaction avec RPA. Ainsi, nous pouvons penser que la variation de la concentration protéique peut avoir des conséquences importantes sur les activités de réparation mesurées sur la puce plasmide du fait des rôles multiples joués par cette protéine.

Nous devons également relier nos différences d'activités, en particulier par rapport aux tests *in vivo* de la littérature, au fait que nous mesurons plusieurs activités de façon conjointe. En effet, comme nous l'avons déjà évoqué des phénomènes de compétition ont vraisemblablement lieu lors de nos réactions d'ER sur support, donc il n'est pas incohérent de trouver des résultats différents de ce qui est observé dans la littérature lors de l'étude de la réparation d'une seule lésion.

IV. Réponse à une irradiation UVB

Nous avons étudié la réparation de lysats nucléaires en réponse à une irradiation des cellules avec de faibles doses d'UVB. Nous avons choisi d'étudier l'effet des UVB plutôt que les UVC car nous avons jugé plus pertinent d'étudier l'effet d'une longueur d'onde d'UV jouant un véritable rôle génotoxique à la surface de la Terre. En effet, les UVC étant arrêtés par la couche d'ozone, l'ADN des organismes vivants n'est en théorie pas lésé par les UVC.

Nous avons étudié la réponse en termes d'activités d'ER, 24h après l'irradiation des cellules à des doses d'UVB n'entraînant pas plus de 15 % de cytotoxicité. Pour les deux modèles cellulaires, nous observons une stimulation des activités de réparation pour le lysat témoin uniquement. Cette stimulation des activités de réparation en réponse à une irradiation UV a déjà été observée (Pitsikas *et al.*, 2005). En effet, des fibroblastes primaires préalablement traités avec une faible dose d'UVC (6 J/m²), voient leur activité HCR augmentée par rapport aux cellules qui n'ont pas été préalablement irradiées. Ils remarquent également que cette stimulation est maximale lorsque l'activité de réparation est mesurée entre 25 et 35 h après l'irradiation préalable des cellules. Dans notre cas, nous avons mesuré les activités d'ER 24 h après l'irradiation, ce qui laisse penser que nous sommes proches du maximum de stimulation observable.

Nous observons que cette stimulation concerne la réparation de l'ensemble des lésions présentes sur la puce. Cependant nous observons que la réparation des petites lésions est plus fortement stimulée par rapport aux photoproduits et aux adduits cisplatine. Une irradiation UVB conduit majoritairement à la formation de photoproduits dans l'ADN (un mélange de 6-4 PPs et de CPDs). Cependant, une irradiation UVB conduit également à la formation de lésions oxydatives (Zhang *et al.*, 1997). Ainsi, nous émettons l'hypothèse que la part de lésions oxydatives générées par l'irradiation UVB stimule fortement les activités enzymatiques de la BER. Il a été montré que l'enzyme UNG2 est phosphorylée, 2 h après une irradiation UV (Lu *et al.*, 2004). En effet, l'irradiation conduit à l'apparition d'uracile dans

l'ADN après désamination de la cytosine. La phosphorylation de l'UNG2 augmente son activité d'excision de l'uracile. Une récente étude a montré l'effet d'une irradiation UVC sur la réparation de lésions oxydatives par la méthode HCR (Kassam *et al.*, 2009). Les auteurs mesurent ici, la réparation de lésions générées par le traitement du vecteur avec le bleu de méthylène irradié en lumière visible. Ils montrent, ainsi, que la réparation de cette lésion est facilitée lorsque les cellules ont été préalablement traitées par des UVC. Ils observent une stimulation d'environ 50 % de la réparation des lésions oxydatives. Ils démontrent, également, par l'utilisation de plusieurs souches aux différents statuts pour p53 (normal, muté, surexprimé, séquestré) que cette stimulation de la réparation des lésions oxydatives par les UVC passe par une voie dépendante de p53 mais peut aussi passer par une voie indépendante de p53. Ainsi, cela suggère que l'irradiation UVB que nous avons réalisée, génère des lésions de l'ADN (photoproduits et lésions oxydatives) capables d'activer la machinerie enzymatique de la réparation et les différentes voies de signalisation notamment celles passant par p53. Les protéines telles XPC, ou DDB2 ont une expression dépendante de p53, c'est-à-dire que l'expression des gènes *XPC* et *DDB2* peut être activée par p53. Ainsi, nous pouvons penser que suite à l'irradiation UVB, il y aura une synthèse accrue des protéines de la réparation. Cette néo-synthèse en réponse aux UV se traduirait par une stimulation des activités de réparation du lysat témoin, mais il n'y aurait pas de stimulation des activités de réparation dans le lysat de cellules déficientes pour la protéine XPC. C'est pourquoi, nous n'observons pas de stimulation des activités de réparation dans le lysat de cellules XPC^{-/-}.

Si l'irradiation UVB a un effet sur l'activation de l'expression de certains gènes de la réparation, nous pouvons également penser que l'irradiation joue un rôle sur la translocation des protéines de la réparation vers le lieu de la lésion. Ainsi, il a été montré qu'après une irradiation UV des cellules, la protéine XPA s'accumule dans le noyau (Wu *et al.*, 2007). Les auteurs ont démontré que la translocation de la protéine XPA du cytoplasme vers le noyau en réponse à un traitement UV dépend du facteur de signalisation ATR. En effet, dans des cellules déficientes pour ATR, la translocation de XPA n'est plus observée. Ainsi, dans notre cas, nous suggérons que l'irradiation des cellules aux UVB provoque la translocation de la protéine XPA vers le noyau, ce qui explique pourquoi la stimulation de l'ER est observée dans le lysat nucléaire témoin et pas dans le lysat nucléaire XPA.

Conclusion générale et perspectives

Nous avons étudié la réparation de l'ADN de lignées déficientes, Xeroderma pigmentosum, en utilisant un test *in vitro* miniaturisé, permettant la quantification conjointe d'activités d'excision ou d'excision-resynthèse de plusieurs lésions de l'ADN à partir d'un même lysat cellulaire. Cette étude apporte de nouvelles informations quant à la mécanistique de la réparation ainsi que sur les interactions et les régulations existantes entre la BER et la NER. L'originalité de cette étude porte, avant tout, sur le fait, qu'ici, la vision de la réparation est globale. En effet nous étudions une réaction enzymatique très complexe de par le grand nombre de facteurs et les différentes étapes, nécessaires à l'élimination de la lésion et à la restauration de la séquence d'ADN. La complexité de la réparation peut être envisagée dans cette étude, du fait que nous étudions une réaction multienzymatique à partir d'un lysat cellulaire contenant à la fois les enzymes et cofacteurs nécessaires à la réparation, mais aussi des inhibiteurs, des protéines régulatrices, des protéines chaperonnes... Par ailleurs, nous avons vu aussi que lorsque nous nous focalisons sur une étape de la réparation, par exemple l'excision (puce oligo), nous perdons de l'information. Cela montre que la réparation doit être pensée de façon dynamique et dans sa globalité, comme nous l'avons fait.

Ainsi, nous avons vu que les paramètres réactionnels comme le temps de la réaction mais aussi la concentration protéique du lysat, influent beaucoup sur le phénotype de réparation de l'ADN obtenu. Nous avons également constaté que l'irradiation préalable des cellules, permet la caractérisation de phénotype de réparation spécifique de chaque groupe de complémentation étudié, A et C.

Les résultats obtenus dans cette étude conduisent à des pistes d'investigations futures. La réparation de l'ADN a été envisagée, dans cette étude, d'un point de vue enzymatique. Pour parfaire cette étude autour des mécanismes réactionnels mis en jeu lors de nos tests, il pourrait être envisagé de tester l'effet d'inhibiteurs sur la réaction enzymatique qui a lieu sur le support. Des études préliminaires ont été menées avec un inhibiteur spécifique des polymérases δ et ϵ , l'aphidicholine. Les résultats n'ont pas montré un effet différent de l'inhibiteur au niveau de l'ER du lysat témoin par rapport aux lysats XP. D'autres inhibiteurs pourraient être testés comme le cadmium, cet élément se substituant au zinc. Ainsi, l'effet inhibiteur du cadmium est, notamment, attendu au niveau des protéines contenant du zinc, comme c'est le cas pour XPA qui est une protéine à doigt de zinc. L'étude de l'effet de ces inhibiteurs sur l'ER, pourrait permettre de préciser l'implication des voies de réparation BER et NER dans la réaction sur support.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence l'implication de la protéine XPA dans l'excision des diols de thymine, sur la puce oligo. Cette observation n'a pas été faite sur la puce plasmide, ce qui suggère que la déficience au niveau de l'excision est masquée par l'étape de resynthèse sur la puce plasmide. Ce résultat ouvre une piste de recherche quant au possible rôle de XPA lors de l'incision de cette lésion.

De plus, nous avons observé un niveau d'excision-resynthèse très élevé de la 8-oxoG avec un lysat nucléaire XPA par rapport au lysat témoin. Peu de données relatent le rôle de XPA dans la réparation de ce type de dommages. Nous pouvons penser qu'il existe, cependant, une dérégulation de la réparation de cette lésion dans les cellules XPA, à l'origine du niveau de réparation élevé, observé sur la puce plasmide. Les conséquences biologiques de cette dérégulation pourraient notamment être à l'origine des troubles neurologiques très fréquents développés par les patients XPA. Ainsi, il serait intéressant d'approfondir ces résultats afin de comprendre quel est le véritable rôle de XPA dans la réparation des dommages oxydatifs.

La réponse au traitement oxydant a été abordée en fin de projet, c'est pourquoi les résultats devront être confirmés. De façon inattendue, nous avons observé que la riboflavine non photo-excitée a un effet stimulateur sur le niveau de réparation du lysat nucléaire témoin et XPA. Les activités d'excision-resynthèse sont inhibées en réponse au traitement oxydant dans le lysat XPC ce qui souligne le comportement différent des cellules XPC par rapport aux autres lignées étudiées. Ainsi, il serait, là aussi intéressant, d'approfondir la régulation de la réponse suite à un traitement oxydant afin de dégager précisément le rôle de XPC dans la réparation des lésions oxydatives.

Enfin notre test sur la puce plasmide pourrait être amélioré au niveau de la mesure des activités d'ER des photoproduits. En effet, nous quantifions la réparation d'un mélange de photoproduits, à savoir des CPDs et des 6-4 PPs. Il pourrait être envisagé d'utiliser des photolyases bactériennes lors de la préparation des plasmides, pour avoir d'un côté des plasmides contenant des CPDs et d'un autre côté des plasmides contenant des 6-4 PPs. Cela nous permettrait d'étudier la réparation spécifique de ces deux lésions. En effet, il a été montré que ces lésions obéissent à des cinétiques et des rendements de réparation différents (Wang *et al.*, 2003). Ainsi, nous pouvons nous questionner quant au mécanisme de réparation spécifique de ces deux lésions dans des lysats XP (Lo *et al.*, 2005).

En conclusion, nos outils développés au laboratoire, bien que ne pouvant pas encore revendiquer l'application diagnostique, sont, néanmoins, des outils exploratoires puissants

permettant de soulever des pistes de recherche nouvelles et intéressantes. Ces pistes devront être ensuite abordées avec des outils de biologie moléculaire en ciblant de façon précise la question biologique.

Chapitre IV

Matériels et Méthodes

Préparation de l'échantillon

Exploitation de l'échantillon

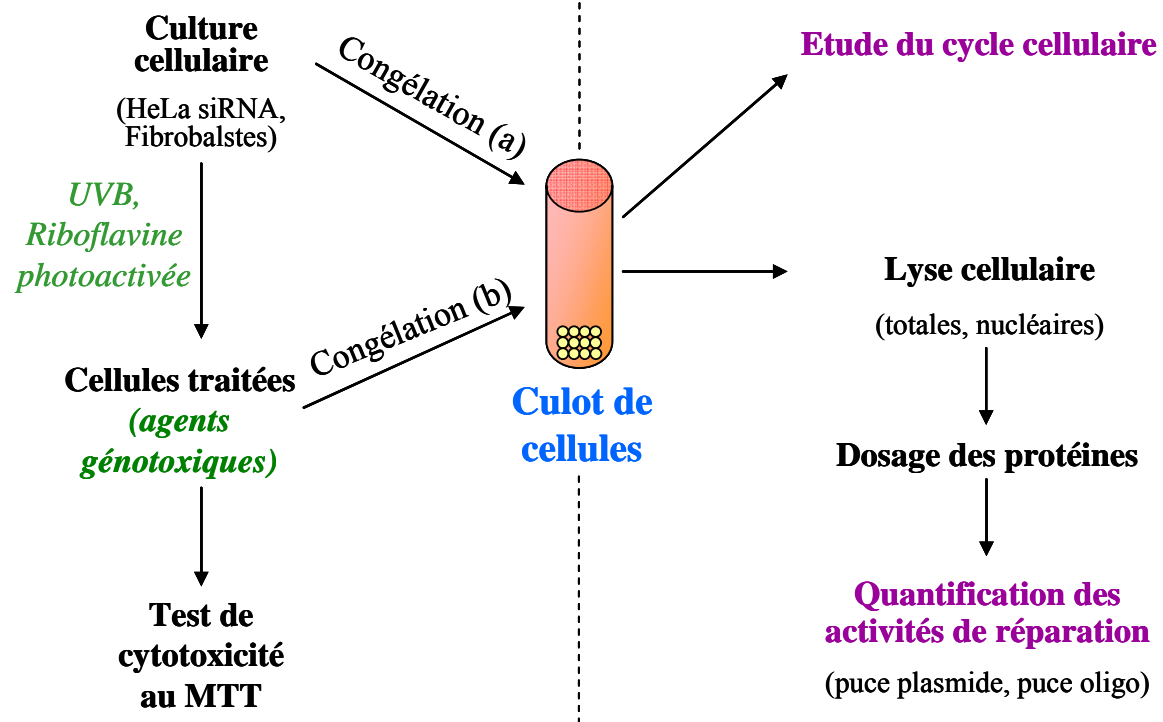


Figure 62: Schéma présentant l'organisation des expériences

Ce chapitre est divisé en deux grandes parties (**Figure 62**). Tout d'abord, la première partie traite des différentes étapes conduisant à la préparation de l'échantillon sous forme d'un culot cellulaire. La deuxième partie est consacrée à la description de l'exploitation de ce culot cellulaire. Deux types d'expériences sont alors réalisés : l'étude du cycle cellulaire et la quantification des activités de réparation sur support miniaturisé.

I. Préparation de l'échantillon

A. Culture cellulaire

1. Produits et matériels

Les milieux de culture, la pénicilline-streptomycine, l'amphotéricine B, la glutamine, le sérum de veau fœtal, la trypsine EDTA, l'hygromycine, l'HEPES, le PBS (sans CaCl_2 et sans MgCl_2 : DPBS) proviennent de Gibco® Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). La trypsine utilisée pour la culture des cellules HeLa siRNA provient de MP Biomedicals (Solon, OH, USA) et l'EDTA provient de chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Les HeLa siRNA sont cultivées dans des boîtes de culture ronde Falcon (6 cm ou 10 cm de diamètre) provenant de chez Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA).

Les fibroblastes sont cultivés dans des flasques (25, 75 et 150 cm^2) provenant de chez Corning (New-York, NY, USA).

2. Culture des HeLa siRNA

La lignée cellulaire HeLa provenant d'un cancer de l'utérus, a été caractérisée dans les années 50 (Scherer *et al.*, 1953), et utilisée en routine dans les laboratoires de recherche pour sa commodité de culture.

Les cellules HeLa siRNA (Small Interfering RNA) utilisées au cours de ma thèse ont été fournies par le Dr. Denis Biard (CEA Fontenay-aux-Roses, laboratoire de génétique de la radiosensibilité) (Biard *et al.*, 2005). Ces cellules HeLa ont été transfectées de façon stable avec un vecteur EBV non-intégratif c'est-à-dire qu'il ne s'intègre pas dans le génome de la cellule transfectée. Les vecteurs conçus par le Dr. Biard contiennent une séquence du virus EBV (Epstein Barr Virus) est sont donc réplicatifs : environ 10 copies du vecteur sont maintenues de façon stable en utilisant la machinerie répliquative de la cellule hôte. L'interférence ARN est, ainsi, efficace sur le long terme. Les cellules transformées par ce type de vecteurs voient l'expression du gène ciblé par le vecteur, éteinte pendant plusieurs centaines de jours (> 300 jours). Le vecteur est maintenu de façon stable dans la cellule hôte

en exerçant une pression de sélection. En effet, le vecteur possède une séquence codant pour la résistance à l'hygromycine. L'ajout de l'antibiotique hygromycine au milieu de culture permet de maintenir une pression de sélection : seules les cellules qui possèdent le vecteur pourront se développer.

Le vecteur pEBV porte une séquence spécifique, laquelle donnera lieu à l'expression d'un shRNA (Short Hairpin RNA) après sa transcription. Le shRNA est ensuite clivé par l'enzyme DICER pour donner un siRNA fonctionnel. Le siRNA est une structure ARN double brin : un des deux brins (appelé brin « guide ») est complémentaire de la séquence de l'ARNm cible (par exemple complémentaire de l'ARNm codant pour la protéine XPA). Le siRNA est alors pris en charge par le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex). Ce complexe ne prend en charge qu'un seul des deux brins du siRNA. L'ensemble va se fixer sur l'ARNm cible. Grâce à l'activité ribonucléase de RISC, l'ARNm cible est coupé en petits fragments de 21 à 23 nucléotides (Stanislawska *et al.*, 2005). L'ARNm cible dégradé ne pourra donc pas être traduit en protéine. Cette méthode permet d'éteindre de façon très spécifique l'expression d'un gène (silencing). Elle est couramment utilisée dans les laboratoires depuis 2001, lorsque l'ARN interférence a été rendu possible dans les cellules de Mammifères par les travaux de l'équipe de Thomas Tuschl (Elbashir *et al.*, 2001).

Les cellules HeLa siRNA utilisées dans cette études correspondent aux clones pBD650 (cellules témoin), pBD634/21 (cellules XPC^{-/-}) et pBD695/6 (cellules XPA^{-/-}).

Les cellules HeLa siRNA sont cultivées avec 8 mL de milieu DMEM (culture en boîte 10 cm de diamètre) avec 4.5 g/L de glucose, 4 mM de L-Glutamine et 110 mg/mL de pyruvate de sodium, supplémenté en L-Glutamine (6 mM final), sérum de veau fœtal non décomplémenté (10%), HEPES (10 mM), pénicilline-streptomycine (220 µg/mL), amphotéricine B (2,5 µg/mL) et hygromycine (125 µg/mL). Les cellules se développent à 37°C avec 5% de CO₂.

Les cellules sont divisées deux fois par semaine : une division de 1/5 à 1/7 (variable suivant la souche) est nécessaire à chaque passage. Pour cela, les cellules sont d'abord rincées avec 2 mL d'EDTA 0,02% puis sont trypsinées avec 1 mL d'EDTA 0,02% et 0,5 mL de trypsine 0,1%. Les cellules se décolent rapidement (1 à 2 min). L'action de la trypsine est arrêtée par du milieu de culture. Les cellules en suspension sont alors réparties dans de nouvelles boîtes de culture.

Type cellulaire	Nom de la souche	Phénotype	Mutation dans les gènes de la réparation	origine
HeLa siRNA	pBD650	Normal	Aucune	Dr. D. Biard
	pBD634/21	XPC ^{-/-}	expression nulle de la protéine	Dr. D. Biard
	pBD695/6	XPA ^{-/-}	expression nulle de la protéine	Dr. D. Biard
Fibroblastes SV40	MRC5	Normal	Aucune	IGR
	AS1WT	XPC ^{-/-}	Mutation homozygote dans l'exon IX (Val ⁵⁴⁸ Ala)	IGR
	XP12ROSV	XPA ^{-/-}	Mutation homozygote non-sens dans l'exon V (Arg ²⁰⁷ - Stop)	IGR
	GM16093	XPC ^{-/-}	?	Coriell Institute for Medical Research
	GM04312	XPA ^{-/-}	Mutation homozygote: transversion G-C intron III (mauvais épissage de l'ARNm)	Coriell Institute for Medical Research
	GM08207	XPB ^{-/-}	Mutation hétérozygote: mutation faux-sens (Arg683- Trp) et délétion de 78 nucléotides dans l'exon III	Coriell Institute for Medical Research
	GM14930	XPG ^{-/-}	Mutation hétérozygote: mutation non-sens (codon 660) et mutation non-sens (Arg ²⁶³ - Stop)	Coriell Institute for Medical Research

Tableau 12 : Répertoire des différentes lignées cellulaires utilisées dans cette étude

3. Culture des fibroblastes

Les fibroblastes utilisés au cours de cette étude ont deux origines différentes : le laboratoire « stabilité génétique et oncogénèse » (CNRS FRE 2939, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France) et le « Coriell Institute for Medical Research » (Camden, NJ, USA). Le principe d'obtention de ses lignées de fibroblaste est le même quelle que soit leur origine : les fibroblastes ont été mis en culture à partir d'une biopsie de peau d'une zone non exposée au soleil (réalisée chez un sujet sain ou chez un patient déficient pour la réparation). Ensuite, les fibroblastes sont transfectés avec le virus SV40 (Simian Virus 40) pour les rendre immortels.

Les fibroblastes provenant de l'IGR sont cultivés dans 15 mL de milieu MEM avec des sels de Earle (culture en flasque 75 cm²), supplémenté en L-Glutamine (2 mM), sérum de veau fœtal décomplémenté (10%), pénicilline-streptomycine (220 µg/mL) et amphotéricine B (0,75 µg/mL).

Les fibroblastes commerciaux sont cultivés dans 15 mL de milieu MEM ou 15 mL de milieu DMEM avec 4.5 g/L de glucose (milieu variable d'une souche à l'autre), supplémenté en L-Glutamine (2 mM), sérum de veau fœtal non décomplémenté (10%), pénicilline-streptomycine (220 µg/mL) et amphotéricine B (2,5 µg/mL). Les cellules se développent à 37 °C avec 5% de CO₂.

Les fibroblastes sont divisés deux fois par semaine : une division de 1/5 à 1/7 (variable suivant la souche) est nécessaire à chaque passage. Pour cela, les cellules sont d'abord rincées avec 10 mL de DPBS puis sont trypsinées avec 1 mL de trypsine EDTA (0,5 g/L trypsine, 0.2 g/L EDTA). Les cellules se décolent rapidement (1 à 2 min). L'action de la trypsine est arrêtée par du milieu de culture. Les cellules en suspension sont alors réparties dans de nouvelles flasques de culture.

L'ensemble des lignées utilisées pour cette étude sont répertoriées dans le **tableau 12**.

4. Détection des mycoplasmes

Tous les 6 mois a été réalisé un dépistage de mycoplasme dans les cellules en culture en utilisant le kit Mycoplasma detection (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Allemagne) basé sur le principe de la technique ELISA. Lors d'une contamination par des mycoplasmes, l'ensemble des cellules en culture est alors traité par un antibiotique spécifique des mycoplasmes, la plasmocine (Amixa GmbH, Köln, Allemagne).

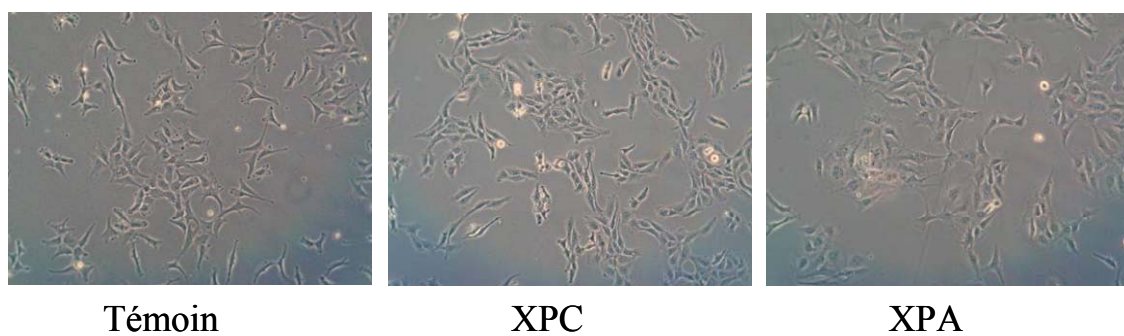


Figure 63: Confluence des cellules au moment de l'irradiation (réponse à l'irradiation UV en terme de niveau d'ER pour les différentes souches)

5. Congélation de cellules

Les cellules sont congelées en vue d'une extraction protéique, lorsqu'elles sont confluentes à 60-70% (Figure 62 , congélation a). Les cellules sont trypsinées comme indiqué ci-dessus, comptées au microscope inversé (grille à usage unique, Kova® slide, Hycor, Garden Grove, CA, USA) puis centrifugées à 400xg pendant 5 min. Le culot cellulaire est repris délicatement par la solution de congélation (milieu de culture et DMSO 10%, ou milieu de culture + DMSO 10% + SVF 20% pour les fibroblastes de l'IGR) et transféré dans des cryotubes (5 x 10⁶ cellules maximum par cryotube, volume final 1 mL). Les cellules sont congelées progressivement jusqu'à -80 °C en utilisant un bicell. Les cellules sont ensuite conservées dans l'azote liquide.

B. Réponse cellulaire face à un traitement génotoxique

Deux types de stress ont été réalisés : un traitement physique (UVB) et un traitement chimique (riboflavine en présence de lumière visible).

1. Irradiation UVB

Pour étudier la réparation de l'ADN sur la puce en réponse à l'irradiation UVB, des culots cellulaires ont été préparés à partir de cellules irradiées. Les cellules siRNA ont été irradiées 24 h après l'ensemencement dans des boîtes de culture de 10 cm de diamètre (ensemencement de 7 x 10⁵ cellules par boîte). Les fibroblastes sont irradiés 48 h après l'ensemencement dans des boîtes de cultures de 10 cm de diamètre (ensemencement de 2,75 x 10⁵ cellules par boîte pour les fibroblastes témoin, de 6 x 10⁵ cellules par boîte pour XPA et 5 x 10⁵ cellules par boîte pour XPC). Les fibroblastes témoin arrivent plus vite à confluence que les fibroblastes XP, c'est pourquoi ils sont ensemencés à une plus faible densité. Les cellules sont irradiées lorsqu'elles sont très peu confluentes (**Figure 63**). Pour l'étude de l'effet de la confluence au moment de l'irradiation, les niveaux de confluence 1, 2 et 3 correspondent respectivement à l'ensemencement de 2,75 x 10⁵ , 5 x 10⁵ ou 1,8 x 10⁶ cellules de fibroblastes témoin par boîte. Au moment d'irradier, toutes les boîtes de culture sont sorties de l'incubateur (même les boîtes correspondant aux cellules non irradiées). Les cellules sont rincées 2 fois avec du DPBS pour éliminer toute trace de milieu de culture qui pourrait absorber les rayonnements UVB. La lampe UV (Vilbert Lourmat, Marne la Vallée, France) est allumée 15 min avant l'irradiation pour qu'elle se stabilise. Elle émet à 312 nm (raie maximale du spectre UVB). La puissance de la lampe est mesurée avant chaque irradiation à l'aide d'un radiomètre VLX3W

(Vilbert Lourmat, Marne la Vallée, France). Pour les irradiations à faibles doses d'UVB ($< 20 \text{ J/m}^2$), une boîte a été confectionnée permettant ainsi de diminuer par 10, l'énergie UV reçue par l'échantillon. Ce dispositif a permis d'irradier à de faibles doses avec des temps d'irradiation gérables ($>10 \text{ s}$). Les cellules sont irradiées à température ambiante dans 4 mL de DPBS en plaçant la boîte de culture, couvercle retiré, sous la lampe UVB pendant la durée déterminée. Les irradiations ne dépassant jamais 2 min, il n'y a pas d'échauffement des cellules dû à l'irradiation. Après l'irradiation, le milieu de culture est remis dans les boîtes et les cellules sont réincubées à 37°C pendant 24 h.

2. Traitement à la riboflavine photo-excitée

Pour étudier la réparation de l'ADN sur la puce en réponse à un stress oxydant, des culots cellulaires ont été préparés à partir de cellules traitées avec de la riboflavine photo-excitée.

En présence d'oxygène et de lumière visible, la riboflavine devient létale. Il a été montré qu'une fois excitée, la riboflavine est cytotoxique et mutagénique (Jazzar *et al.*, 1996). La riboflavine peut être excitée par les UVA et les UVB mais aussi par la lumière visible. Nous avons choisi l'excitation par la lumière visible pour s'affranchir des effets génotoxiques propres aux UV. En effet, les UVA bien qu'entraînant la formation de bases oxydées dans l'ADN, conduit également tout comme les UVB à la formation de photoproduits (Courdavault *et al.*, 2004a). Une fois excitée, la riboflavine peut arracher un électron à l'ADN ce qui conduit principalement à la formation de 8-oxoG dans l'ADN (Ito *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1998; Douki *et al.*, 1999). Il est à noter que le milieu de culture utilisé pour la culture des fibroblastes contient $0,2 \text{ }\mu\text{M}$ de riboflavine. Pour étudier la réponse à un traitement génotoxique, les cellules sont incubées avec 10 fois plus de riboflavine que ce que contient le milieu de culture ($2 \text{ }\mu\text{M}$).

Les cellules sontensemencées avec la riboflavine 72h avant l'irradiation afin que la cellule ait le temps d'incorporer la vitamine. Une solution mère concentrée à $240 \text{ }\mu\text{M}$ de riboflavine dans du milieu de culture a été filtrée et conservée à 4°C ; cette solution a été utilisée pour la préparation des culots cellulaires des trois souches étudiées (MRC5, XP12ROSV et AS1WT). Les cellules sontensemencées dans des boîtes de 10 cm de diamètre. Le jour de l'irradiation, les cellules sont protégées de la lumière par du papier aluminium. Les cellules sont irradiées pendant 5 min en plaçant la boîte, couvercle retiré, sous une lampe halogène (puissance maximale de 500 W). Une enceinte en verre à double parois avec de l'eau froide circulante est placée entre la boîte de cellules et la lampe pour diminuer l'échauffement dû à l'éclairage. A la fin de l'irradiation, les cellules sont replacées à l'incubateur à 37°C .

3. Test de cytotoxicité

Pour évaluer la cytotoxicité du stress appliqué aux cellules, le test MTT est réalisé 24 h après la fin du stress. Le MTT est un sel de tetrazolium jaune, réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale en cristaux de formazan insoluble de couleur violette. Dans ce test, l'activité métabolique liée à la respiration de la cellule permet donc d'évaluer leur viabilité.

Pour plus de commodité, les tests de cytotoxicité ont été réalisés en plaque 6 puits (3,5 cm de diamètre). Pour le stress UVB, 60 000 cellules sontensemencées par puits pour MRC5 et AS1WT, 70 000 cellules pour XP12ROSV car elles poussent moins vite, afin d'avoir une confluence le jour de l'irradiation similaire à ce qui est obtenu en boîte 10 cm de diamètre. Les cellules sont incubées pendant 48 h avant l'irradiation UVB. Pour le stress oxydatif, les cellules sontensemencées à 15 000 cellules par puits pour MRC5 et AS1WT et 18 000 cellules pour XP12ROSV. Les cellules sontensemencées avec la riboflavine et irradiées 72h après l'ensemencement. Dans les 2 cas, 24 h après le stress, 200 µL d'une solution de MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) préparée dans du DPBS à 5 mg/mL sont ajoutés à chaque puits (dilution au 1/10^e). Les cellules sont incubées pendant 2 h avec le MTT puis rincées une fois avec 1 mL de DPBS. 3 mL de DMSO (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) sont ensuite ajoutés par puits, et les plaques sont agitées pendant 20 min à température ambiante pour bien homogénéiser. Le DMSO est capable de pénétrer la membrane plasmique et permet la solubilisation des cristaux de formazan. L'absorbance de la solution violette ainsi obtenue est mesurée à 560 nm. L'échantillon témoin d'absorbance est réalisé sur le DMSO seul. La mesure de l'absorbance permet de déterminer le pourcentage de survie : le 100% de survie correspond aux cellules qui n'ont pas subi de stress. Le pourcentage de survie pour chaque condition du stress est ensuite calculé par rapport au témoin non stressé.

4. Récolte des cellules après un traitement génotoxique en vue de préparer des culots de cellules

Les cellules sont récoltées 24 h après le stress (Figure 62, congélation b). Les cellules sont rincées une fois avec 2 mL de DPBS. Les cellules sont ensuite décollées avec 1 mL de trypsine EDTA, puis elles sont récupérées à l'aide d'un grattoir (Becton Dickinson Franklin Lakes, NJ, USA). L'action de la trypsine est arrêtée avec 2 mL d'une solution DPBS-10% SVF. Les cellules sont ensuite transférées dans un tube de 15 mL. Les cellules sont comptées au microscope inversé. Le culot de cellules est repris par la solution de congélation (milieu de culture + DMSO 10%, ou milieu de culture + DMSO 10% + SVF 20% pour les fibroblastes

de l'IGR) et les cellules sont réparties dans des cryotubes (entre 4 et 5 x 10⁶ cellules par cryotubes). Les cellules sont ensuite congelées comme décrit précédemment. Les culots de cellules sont alors prêts à l'emploi pour effectuer l'extraction de protéines.

II. Exploitation de l'échantillon

A. Etude du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Pour étudier l'effet du stress sur le cycle cellulaire, les cellules sont traitées suivant les modalités décrites précédemment (CF I. B. 1 et I. B. 2). Les cellules sont récoltées 24 h après le traitement comme décrit précédemment mais au lieu de reprendre le culot par la solution de congélation, les cellules sont alors rincées, une fois, avec du DPBS, et fixées avec de l'éthanol 70% froid. Cette fixation à l'éthanol perméabilise les membranes et permet à l'iodure de propidium de rentrer dans la cellule. Les cellules fixées sont conservées au maximum une semaine à -20 °C. Au moment de l'analyse du cycle cellulaire, les cellules sont rincées une fois avec du DPBS. Le culot de cellules est ensuite repris par une solution de DPBS contenant de la RNase A (10 µg/mL) et de l'iodure de propidium (IP) (1/100^e). L'ajout de RNase A permet de dégrader l'ARN cellulaire pour mesurer uniquement la fixation de l'IP sur l'ADN. L'iodure de propidium est un intercalant de l'ADN et une molécule fluorescente. Ainsi, l'IP est excité aux longueurs d'onde comprises entre 370 et 560 nm et émet à 631 nm. L'analyse proprement dite du cycle cellulaire a été réalisée au moyen d'un FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Les résultats ont été traités avec le logiciel Cellquest Pro (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Le logiciel indique la valeur maximale prise par la courbe (Nombre d'événements = f(IP)) pour chaque marqueur (*Peak Chanel*) et aide ainsi à positionner les phases G1 et G2 de façon précise.

B. Etude de la réparation

1. Préparation des lysats cellulaires

La littérature scientifique fait référence aux termes « nuclear extracts », « whole cell extracts » pour décrire l'obtention et l'utilisation d'un mélange de protéines cellulaires. Le terme « extraire » signifie « tirer une matière, obtenir une substance en la séparant d'un corps par voie physique ou chimique » (dictionnaire Larousse). L'extraction se réfère donc à une méthode active, spécifique, on sait exactement ce qui va être obtenu. Le terme « lyse » quant à lui signifie « fragmentation et désintégration de la structure moléculaire des tissus, ou des

cellules bactériennes, exercées par des agents physiques, chimiques ou biologiques » (dictionnaire Larousse). La lyse semble être une méthode plus passive que l'extraction, la cellule est désintégrée et son contenu n'est pas clairement défini. C'est pourquoi, le terme « lysat » est ici préférentiellement utilisé.

a) Lysats nucléaires

La lyse se fait à partir de culots cellulaires conservés dans l'azote liquide. Le protocole de lyse nucléaire a été optimisé pour travailler à partir d'un minimum de 3×10^6 cellules et un maximum de 5×10^6 cellules. L'ensemble des étapes de la lyse est réalisé à 4 °C. Les cellules sont décongelées dans un bain d'eau froide, puis centrifugées à 400xg pendant 5 min. Le culot est repris par 1 mL de PBS pour rincer les cellules. Le culot de cellules est ensuite repris par le tampon A (HEPES pH 7,9 10 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, KCl 10 mM, Triton X-100 0.02%, DTT 0.5 mM, PMSF 18 µg/mL) préparé le jour de la lyse, filtré et conservé dans la glace. Un millilitre de tampon A est ajouté pour 1×10^6 cellules. Les cellules sont incubées pendant 20 min avec le tampon A. A la fin de cette incubation, les cellules sont agitées pendant 30 s pour faciliter la lyse membranaire. L'efficacité de la lyse est vérifiée au bleu trypan : plus de 90 % des cellules sont colorées en bleu, témoignant de la réussite de la première lyse. Une centrifugation à 3220xg pendant 5 min permet de culotter les noyaux intègres. Les protéines cytoplasmiques sont alors situées dans le surnageant qui est éliminé. Le culot est ensuite repris par le tampon B (HEPES pH 7,9 10 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, KCl 400 mM, EDTA 0.2 mM, Glycérol 25%, DTT 0.5 mM, PMSF 18 µg/mL, antiprotéase 0.7X (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Allemagne)) préparé le jour de la lyse, filtré et conservé dans la glace. 12,5 µL de tampon B sont ajoutés pour 1×10^6 cellules. Les noyaux sont incubés pendant 20 min avec le tampon B. Pour faciliter la lyse des noyaux, deux congélations (dans l'azote liquide)-décongélations (à 4 °C) sont réalisées. Une centrifugation à 16000xg pendant 10 min permet de séparer les débris membranaires des protéines nucléaires contenues dans le surnageant. Le lysat est alors aliquoté par 5 ou 10 µL et conservés à -80 °C jusqu'à son utilisation. Deux microlitres sont également prélevés pour le dosage des protéines (dilution 1/160 dans de l'eau désionisée).

b) Lysats totaux

Comme pour la préparation des lysats nucléaires, la lyse totale des cellules est réalisée à partir de culots cellulaires conservés dans l'azote liquide. Là encore, le protocole de lyse totale des

cellules a été optimisé pour travailler à partir d'un minimum de 3×10^6 cellules et un maximum de 5×10^6 cellules. L'ensemble des étapes de la lyse est réalisé à 4 °C. Les cellules sont décongelées dans un bain d'eau froide, puis centrifugées à 400xg pendant 5 min. Le culot de cellules est rincé avec 1 mL de PBS. Le culot de cellules est ensuite repris par le tampon A (HEPES KOH pH 7,9 90 mM, KCl 800 mM, EDTA 2 mM, Glycérol 20%, DTT 1 mM) préparé le jour de la lyse, filtré et conservé dans la glace. Pour 1×10^6 cellules, 7,5 µL de tampon A sont ajoutés. La lyse des cellules est alors facilitée par 3 séries de congélation (dans l'azote liquide)-décongelations (à 4 °C) puis par l'addition de 2 µL de tampon B (Tampon A avec du Triton X-100 à 1%) pour 1×10^6 cellules. Une étape de congélation-décongelation renforce l'action du triton. Enfin est ajouté le tampon C (HEPES KOH pH 7,9 45 mM, EDTA 0,25 mM, Glycérol 2%, antiprotéase 0,7X (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Allemagne), PMSF 18 µg/mL) : 5,5 µL de tampon C pour 1×10^6 cellules. Deux séries de congélation (dans l'azote liquide)-décongelations (à 4 °C) permettent de finaliser la lyse des membranes plasmiques et nucléaires. La lyse totale est vérifiée au bleu trypan : les cellules sont colorées en bleu. Une centrifugation à 16000xg pendant 5 min permet de récupérer les protéines totales. Le surnageant contenant le lysat cellulaire est aliquoté par 5 ou 10 µL et conservés à -80 °C jusqu'à son utilisation. 2 µL sont également prélevés pour le dosage des protéines (dilution 1/250è dans de l'eau désionisée).

2. Dosage de protéines

La concentration en protéine est déterminée par la méthode de l'acide bicinchoninique à l'aide du kit MicroBC Assay Protein quantification (Interchim, Montluçon, France). Les protéines placées en milieu alcalin sont capables de réduire les ions Cu^{2+} en ion Cu^+ . Le sel de sodium de l'acide bicinchoninique réagit alors avec les ions Cu^+ en formant un complexe de couleur pourpre soluble dans l'eau et présentant une forte absorption à 562 nm.

Le dosage est réalisé en microplaque 96 puits. La gamme étalon est effectuée à partir d'une solution étalon de BSA de concentration connue (2 mg/mL). Le volume réactionnel est de 100 µL et chaque condition est dupliquée. Trois dilutions sont réalisées pour le dosage à partir de la solution préparée à la fin de la lyse cellulaire (1/160è pour les lysats nucléaires et 1/250è pour les lysats totaux). 100 µL de réactif MicroBC assay sont ajoutés dans chaque puits et la microplaque est incubée pendant 1 h à 60 °C. L'absorbance est mesurée à 560 nm et permet la quantification de la concentration en protéines de chaque lysat.

3. Caractérisation des lysats vis à vis de la présence de la protéine XPA

Les lysats ont été caractérisés par l'analyse de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) suivie par un western-blot. Pour cela, le lysat est dénaturé (réduction des ponts disulfures des protéines) en le mélangeant à une solution de Laemli (Bio-rad, Hercules, CA, USA) 5 % β Mercaptoéthanol et en chauffant l'ensemble à 90 °C pendant 2 fois 5 min. Les protéines contenues dans le lysat sont séparées sur un gel d'électrophorèse avec 10 % d'acrylamide et contenant du SDS (gel dénaturant). Pour chaque lysat, 15 μ g de protéines ont été déposés. La migration dure 1 h à 150 V. Le tampon de migration contient 25 mM de tampon Tris, 192 mM de Glycine et 0,1 % de SDS. Le marqueur de poids moléculaires utilisé provient de chez Fermentas (Burlington, Canada).

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 45 min à 100 V. Le tampon de transfert contient 0,1 % de SDS et 30 % de méthanol.

La membrane est ensuite saturée dans une solution de TBS (Euromedex, Souffelweyersheim, France)-Tween 0,5 % contenant 5 % de lait. Cette étape sert à saturer les espaces vides de la membrane c'est-à-dire les sites sans protéine pour éviter les fixations non spécifiques des anticorps. La saturation se fait sur la nuit à 4 °C sous agitation.

La membrane est ensuite incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps primaire (Anti-XPA ou Anti- β actine) dilué dans du tampon TBS-Tween 0,5 %-Lait 5 %. L'anticorps anti-XPA (Lab Vision, Fremont, CA, USA) est dilué au 1/1000^e dans le tampon alors que l'anticorps anti- β actine (Santa Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA, USA) est dilué au 1/10 000^e. A la fin de la fixation primaire, la membrane est rincée dans du tampon TBS-Tween 3 fois 5 min sous agitation.

Enfin la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (anti-souris) (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Angleterre) couplé à la peroxydase et dilué au 1/20 000^e dans du tampon TBS-Tween.

La dernière étape du western blot consiste à révéler la fixation de l'anticorps secondaire au moyen du kit ECL Plus (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Angleterre). La peroxydase liée à l'anticorps secondaire va alors réagir avec son substrat contenu dans le kit pour donner un produit photoluminescent. Pour finir, la membrane est exposée à un film photographique pendant 3 ou 5 min.

4. Test de mesure d'activités de réparation sur support miniaturisé

Deux tests *in vitro* miniaturisés sont actuellement disponibles au laboratoire: la puce dite « plasmide » (a) (Millau *et al.*, 2008b) et la puce dite « oligo » (b) (Sauvaigo *et al.*, 2004). La

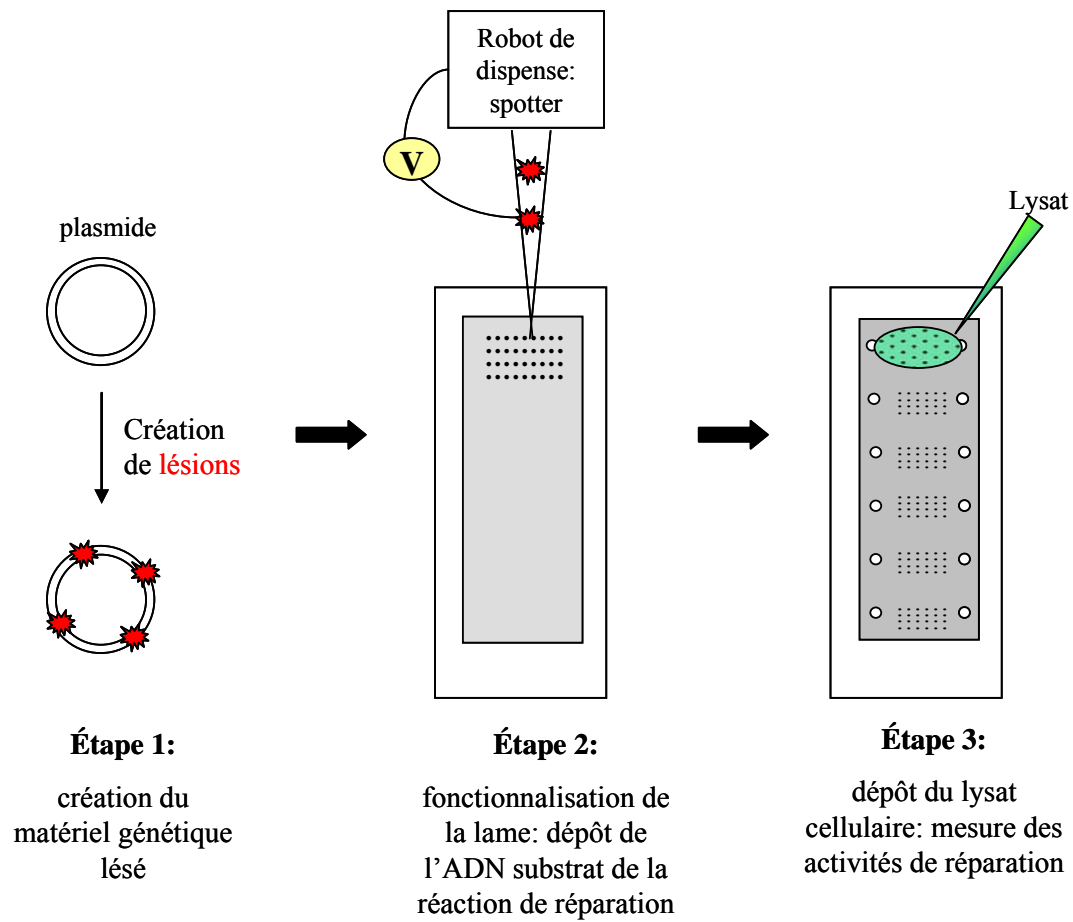


Figure 64: Les différentes étapes du test excision-resynthèse (Puce plasmide)

puce « plasmide » est constituée d'ADN plasmidique fixé sur un support alors que la puce « oligo » est constituée d'oligonucléotides (oligo). De plus, la puce plasmide permet de mesurer des activités d'excision et de resynthèse alors que la puce oligo s'intéresse uniquement à l'activité d'excision du lysat cellulaire. Dans les deux cas, il faut distinguer deux phases dans la réalisation du test de réparation : la fonctionnalisation du support avec le dépôt des plasmides ou des oligonucléotides et la réaction de « réparation » où un lysat cellulaire réagit avec l'ADN du support.

a) Puce plasmide

Le schéma ci contre récapitule les trois étapes conduisant à la mesure d'activités d'excision-resynthèse (**Figure 64**). La première étape consiste à créer le substrat de la réaction à savoir de l'ADN plasmidique comportant des lésions. Dans un deuxième temps, les plasmides sont déposés sur le support composé d'une lame de verre recouverte d'un hydrogel. La dernière étape consiste à la mise en oeuvre de la réaction d'excision-resynthèse sur le support.

i. Création du matériel génétique (plasmide lésé)

Les plasmides sont traités par des agents chimiques ou physiques afin de créer différents types de dommages de l'ADN (Millau *et al.*, 2008b). Un plasmide déposé sur le support contiendra un type de dommage. Les plasmides ainsi modifiés sont contrôlés pour vérifier l'intégrité du plasmide lui-même et pour contrôler la nature et la quantité des lésions.

Ainsi, une électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée pour contrôler l'intégrité des plasmides comportant des lésions. Si la proportion de plasmides sous forme super-enroulée est inférieure à 85 %, nous considérons que le « lot » de plasmides est inutilisable. En effet, les plasmides peuvent perdre leur forme super enroulée notamment si une coupure simple brin est induite (forme relaxée du plasmide). L'apparition de ces cassures simples brins peut être spontanée, mais elles apparaissent principalement lors de certains traitements utilisés pour former les lésions. La présence de ces cassures peut conduire à des réactions d'excision-resynthèse non spécifiques sur la puce.

La nature et la quantité de lésions sont, elles, vérifiées par spectrométrie de masse (Millau *et al.*, 2008b). Le test d'ER a été optimisé pour avoir une intensité de fluorescence du même ordre de grandeur pour toutes les lésions présentes sur le support. Ainsi, la quantité de dommages par plasmide a été optimisée par J.F Millau de manière à avoir un signal fluorescent équilibré entre les différentes lésions.

ii. Fonctionnalisation du support

La deuxième étape consiste à fabriquer la puce en déposant les plasmides comportant des lésions sur le support. Le support de la puce plasmide est une lame de verre recouverte d'un hydrogel. Il était commercialisé par Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) ; début 2007, le fournisseur a décidé d'arrêter sa production de lame hydrogel. L'ensemble des expériences présentées dans ce manuscrit ont été réalisées sur des supports Perkin Elmer, en les utilisant avec parcimonie pour en avoir suffisamment pour l'ensemble des expériences présentées dans cette étude. Le support contient 6 « pavés » c'est-à-dire 6 puces indépendantes. Les supports sont utilisés au minimum 2 semaines après le dépôt des plasmides et sont stables pendant 6 mois.

Le dépôt des plasmides est réalisé au moyen d'un robot de dispense (sciFLEXARRAYER S5 Scienion, Berlin, Allemagne). L'automate est équipé d'un système piezoélectrique permettant de déposer des gouttes de très petits volumes (de l'ordre du nanolitre) sans contact avec le support. Six plasmides lésés (pCPD-64, p8oxoG, pAbaS, pCisP, pAlkB et pGlycol) sont déposés sur le support à 3 dilutions différentes (1/1, $\frac{3}{4}$ et $\frac{1}{2}$). Les dilutions de plasmides lésés sont réalisées dans une solution de plasmide contrôle pour que chaque spot contienne la même quantité d'ADN quelle que soit la dilution considérée. Chaque dilution de plasmide lésé est déposée sur le support en triplicat. Un plasmide contrôle est également déposé sur le support (17 dépôts différents) ; il ne contient pas de lésion de l'ADN. La puce contient donc 71 (54 + 17) plasmides spottés sur le support selon un plan défini de façon aléatoire (le même plan de dépôt est utilisé pour chaque spottage).

iii. Réaction in vitro d'excision-resynthèse à partir de lysat cellulaire

La dernière étape consiste à incuber le support fonctionnalisé avec le lysat cellulaire. Lors de l'expérience de réparation sur puce plasmide, un cache en plastique (Grace Biol-Labs, Bend, OR, USA) est collé sur chaque puce. Ce cache délimite des chambres réactionnelles où un lysat cellulaire peut réagir avec les 71 dépôts de plasmides. Le mix réactionnel de 25 μ L est déposé dans chaque chambre. Le mix contient 5 μ L de lysat cellulaire (à la concentration souhaitée dans le tampon ayant servi à la lyse. Par exemple pour un lysat nucléaire, il s'agit du tampon B), 5 μ L de tampon ATG 5X (200 mM Hepes KOH pH 7,8, 35 mM $MgCl_2$,

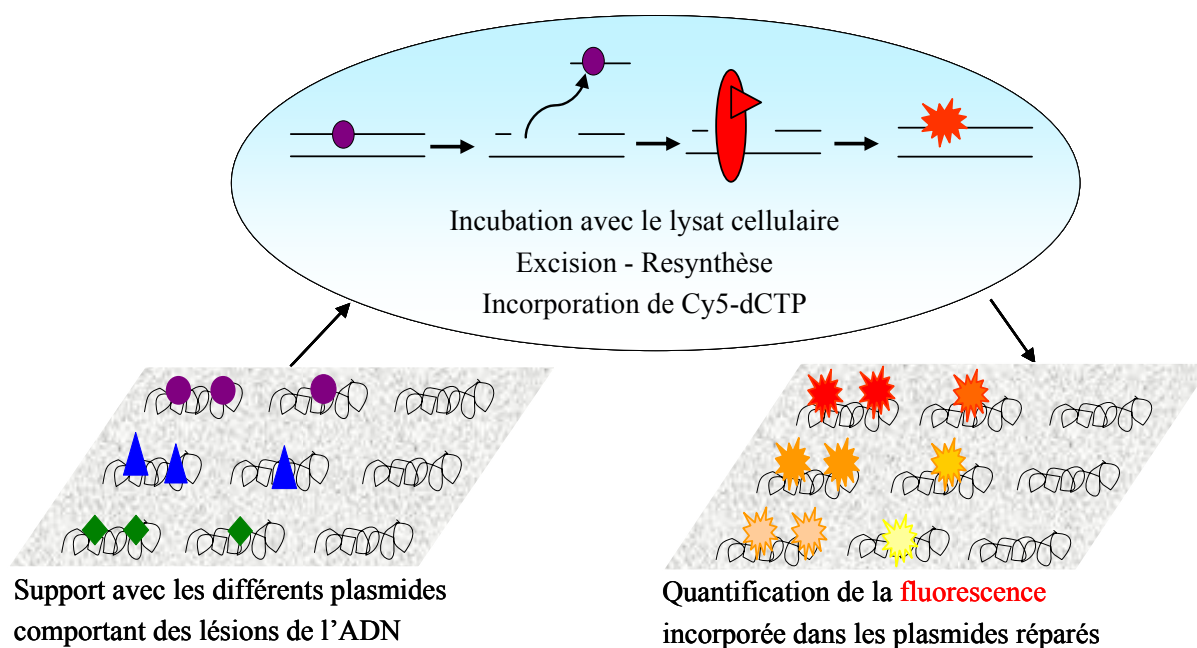


Figure 65: Le principe du test excision-resynthèse sur puce plasmide

Espèce chimique	concentration lors de la réaction sur la puce plasmide
HEPES KOH pH 7,8	42 mM
MgCl ₂	7,3 mM
KCl	80 mM
ATP	2 mM
DTT	0,6 mM
EDTA	2,04 mM
dGTP	0,4 µM
dATP	0,4 µM
dTTP	0,4 µM
dCTP-Cy5	0,25 µM
Glycérol	8,4%
BSA	0,1 g/L
Phosphocréatine	10 mM
Créatine phosphokinase	50 mg/L
PMSF	20µM
Antiprotéase	28µM

Tableau 13 : Concentration des réactifs lors de la réaction sur la puce plasmide

2,5 mM DTT, 2 μ M dATP, 2 μ M dTTP, 2 μ M dGTP, 17 % Glycérol, 50 mM phosphocréatine, 10 mM EDTA, 250 mg/L de créatine phosphokinase, 0,5 g/L BSA), 0,5 μ L ATP 100 mM et de 0,625 μ L Cy5-dCTP 10 μ M. Le principe de la réaction d'excision-resynthèse est rappelé dans la **figure 65** et le **tableau 13** résume toutes les conditions de concentrations régissant la réaction d'excision-resynthèse sur la puce plasmide.

Un film autocollant est collé sur le support pour boucher les trous d'injection et éviter ainsi toute évaporation. L'ensemble est incubé à 30 °C pendant une durée fixée (cinétique possible de 1 à 3 h). A la fin de l'incubation, le cache plastique est retiré et la lame est rincée deux fois 3 min dans une solution de PBS-Tween 0,05 % puis deux fois 3 min dans de l'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore, Billerica, MA, USA). Les lames sont ensuite séchées grâce à une centrifugation à 100 xg pendant 3 min puis incubées pendant 5 min à 30 °C.

Chaque lame est ensuite placée dans le scanner (GenePix 4000B, MDS Analytical Technologies, Union City, CA, USA) afin de mesurer l'intensité de fluorescence correspondant à chaque dépôt de plasmides. Pour visualiser la fluorescence du Cy5, le laser est réglé sur la longueur d'onde 635 nm. Le gain du photomultiplicateur du scanner est réglé pour chaque expérience en fonction de l'intensité de fluorescence obtenue. Néanmoins le gain reste le même pour l'ensemble « des pavés » d'une même expérience. Une fois l'intensité de fluorescence quantifiée pour chaque « pavé », l'application *NormalizeIt* permet de lisser les données. Cette application a été développée en collaboration avec le laboratoire de Cancérologie Expérimentale du CEA de Fontenay-aux-Roses. *NormalizeIt* compare les intensités de fluorescence des répliquas techniques que nous réalisons. En effet, le même lysat est déposé sur deux ou trois lames différentes afin de répéter techniquement la réaction d'ER. En théorie, les intensités de fluorescence devraient être identiques pour tous les répliquas. Cependant, les signaux de fluorescence peuvent varier d'une lame à l'autre ce qui introduit un biais dans nos résultats. *NormalizeIt* applique donc un facteur correctif aux données d'intensité de fluorescence afin de limiter la variabilité expérimentale. Pour plus de détails, le principe de la normalisation est explicité dans l'article (Millau *et al.*, 2008b). Les données normalisées sont ensuite traitées dans Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA).

b) Puce oligo

Comme pour la puce plasmide, le test d'excision sur puce oligo peut être résumé par trois étapes (**Figure 66**). Tout d'abord la première étape de fonctionnalisation du support avec le

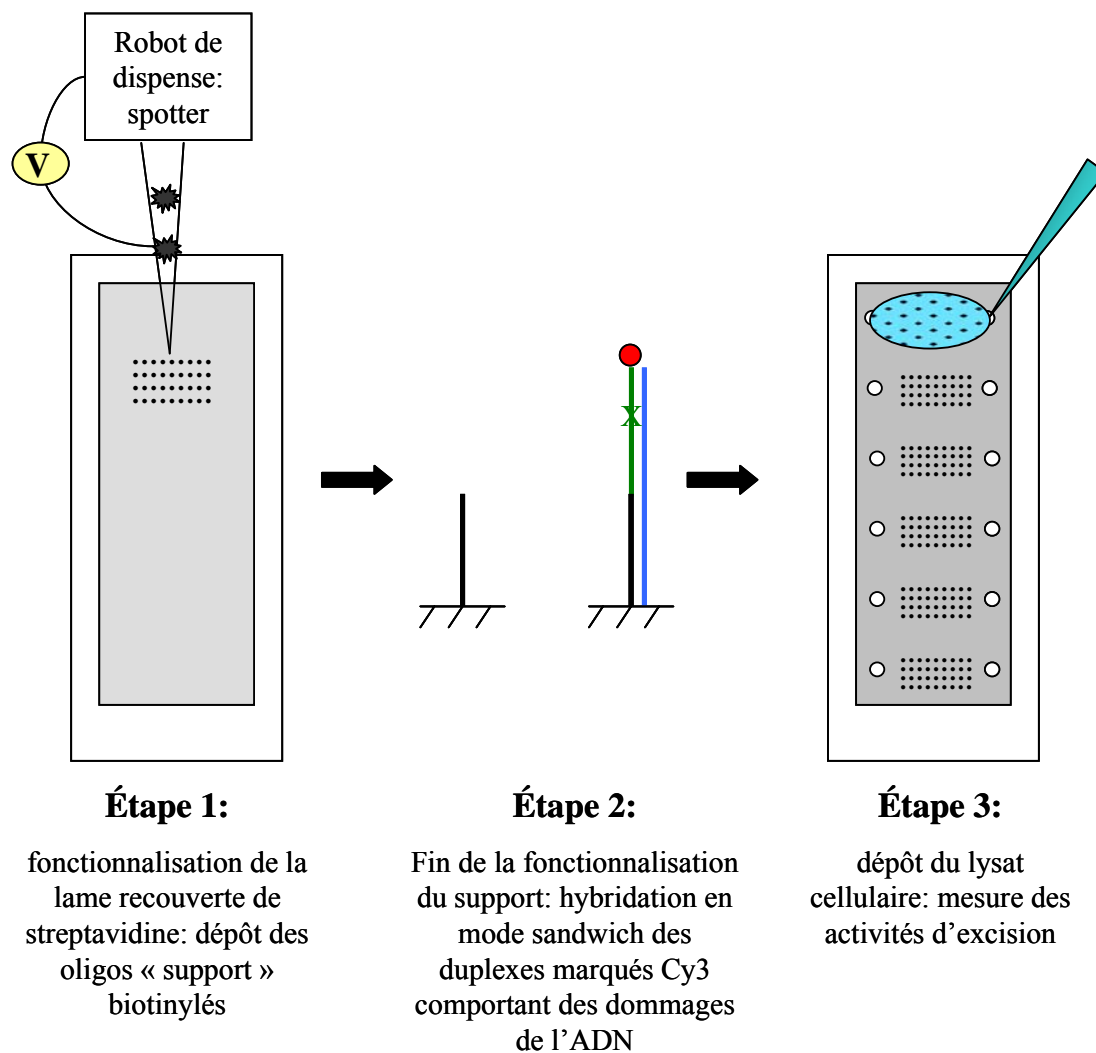


Figure 66: Les différentes étapes du test excision (Puce oligo)

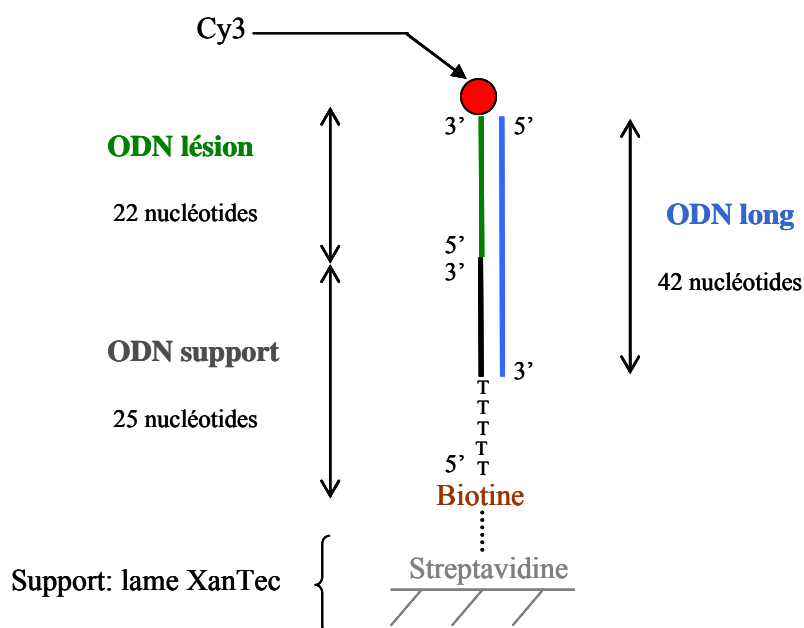


Figure 67: Principe de l'hybridation en mode sandwich

dépôt d'oligonucléotides de 25 nucléotides de long (Eurogentec, Liège, Belgique). Une deuxième étape de fonctionnalisation est ensuite nécessaire et consiste en la formation des duplexes d'ODN sur le support. A la fin de cette étape, la puce est entièrement fonctionnalisée et est constituée d'ODN comportant des modifications de bases. Enfin, la réaction biochimique d'excision est réalisée lors de la dernière étape.

i. Dépôt des ODN « support »

Le support utilisé est une lame de verre recouverte d'un polymère fonctionnalisé par de la streptavidine (XanTec bioanalytics, Düsseldorf, Allemagne). Les dépôts d'ODN qualifiés de « support » sont réalisés avec le même robot que pour la fonctionnalisation de la puce plasmide. Les ODN supports sont biotinylés en 5' ce qui permet leur fixation sur le support grâce à la formation d'une liaison non-covalente forte entre la biotine et la streptavidine. Les ODN supports sont constitués de 25 nucléotides (**Figure 67**). Les lames utilisées pour les expériences présentées dans cette étude comprennent 24 pavés, chaque pavé comprenant 26 dépôts d'ODN supports. Quatre lames peuvent être insérées en même temps dans une microplaque 96 puits permettant ainsi de délimiter des chambres réactionnelles où un lysat cellulaire peut réagir avec les oligonucléotides d'un pavé (TeleChem International, Sunnyvale, CA, USA).

ii. Hybridation des duplexes d'ADN

Lors de la deuxième étape, des duplexes d'ADN sont formés en solution en mélangeant 0,625 μM d'ODN dit « lésion » et 0,5 μM d'ODN appelé « long » dans un tampon PBS/NaCl 0,2 M. Les séquences des ODN « lésion » et ODN « long » sont complémentaires ce qui permet leur hybridation après 5 min à 80 °C et un retour progressif à la température ambiante. Les ODN « lésion » sont marqués en 3' avec un fluorochrome Cy3 et possède une base modifiée entre les nucléotides 6 et 9 en 3' (Eurogentec, Liège, Belgique). L'ODN « lésion » compte 22 nucléotides et l'ODN « long » compte 42 nucléotides. La séquence de l'ODN « long » est choisie de telle façon à ce que les 20 derniers nucléotides en 3' soient complémentaires des 20 nucléotides de l'ODN « support ». Cette astuce permet de connaître précisément où vont se fixer les différents duplexes d'oligonucléotides (portant chacun un dommage différent) sur les ODN « support ». Dans un deuxième temps, il s'agit d'hybrider les duplexes (ODN « lésion » + ODN « long ») aux ODN « support » afin que la lame soit totalement fonctionnalisée. Pour cela, les lames sont rincées 3 fois 3 min avec le tampon

Base modifiée	Abbréviation sur les graphes	Enzyme de la BER associée à l'incision de la lésion
8oxo-G (en face d'un C)	C-8oxoG	OGG1
A (en face d'une 8oxo-G)	8oxoG-A	MUTYH
Thymine glycol (en face d'un A)	A-TG	NTH1, NEIL1
Sites abasique	A-THF	APE1
T (en face d'un G dans une séquence CpG)	CG-GT	MBD4
Inosine (en face d'un T)	T-Ino	MPG
Dihydrothymine (en face d'un A)	A-dHT	NTH1, NEIL1
Ethénoadénine (en face d'un T)	T-EthdA	MPG
T (en face d'un G)	G-T	TDG
Uracile (en face d'un A)	A-U	UNG, SMUG1
Uracile (en face d'un G)	G-U	UNG, TDG, SMUG1
Contrôle négatif sans lésion	Témoin	Pas d'incision

Tableau 14 : Les différents ODN présents sur la puce oligo

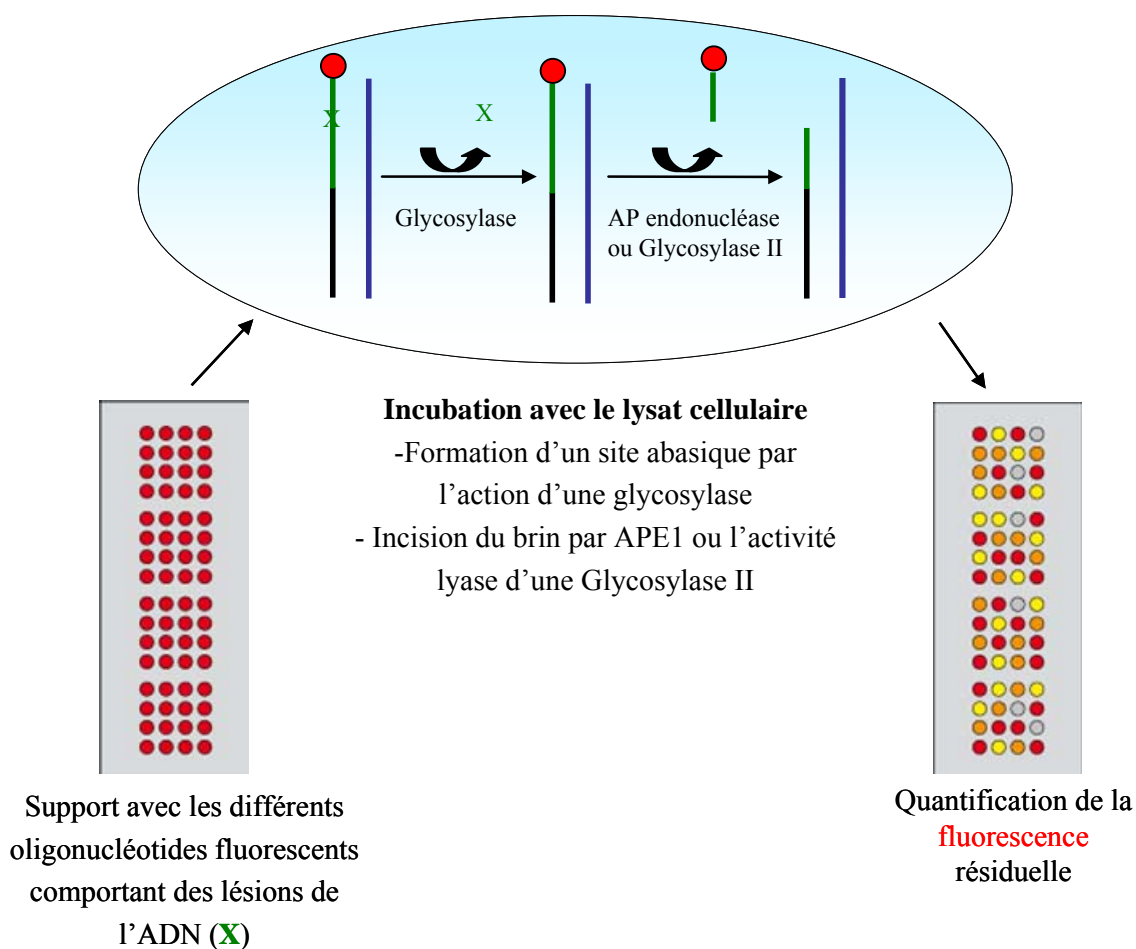


Figure 68: Le principe du test excision sur puce oligo

PBS/NaCl 0.2 M ayant servi à préparer le mélange de duplexes. 80 µL du mélange de duplexes sont ensuite déposés sur la lame fonctionnalisée avec les ODN « support ». L'hybridation en mode sandwich entre le duplex préalablement formé et l'ODN « support » est réalisée lors de l'incubation de la lame à 37 °C pendant 1 h (**Figure 67**). La lame est ensuite rincée 3 fois 5 min avec le tampon d'excision (10 mM HEPES/KOH pH 7,8, 2 mM EGTA, 80 mM KCl, 0.1 mM ZnCl₂, 1 mM DTT). A ce stade, le support est entièrement fonctionnalisé : il contient des oligonucléotides doubles brins marqués Cy3 et comportant des dommages de l'ADN spécifiques. Le **tableau 14** récapitule les différentes bases modifiées dont l'incision peut être mesurée sur le support.

iii. La réaction d'excision sur le support à partir de lysat cellulaire

Les lysats cellulaires sont dilués dans le tampon d'excision contenant 0.5 mg/mL de BSA. La concentration protéique du lysat cellulaire est de 0,5 µg/mL ou de 20 µg/mL lors de la réaction d'excision sur la puce. 100 µL du mix contenant le lysat cellulaire sont ensuite déposés sur chaque pavé. L'ensemble est incubé à 30 °C pendant 1 h. Le principe de la réaction qui a lieu sur le support est schématisé dans la **figure 68**.

A la fin de l'incubation, la lame est rincée 3 fois 5 min avec une solution de PBS/NaCl 0.2 M/Tween 0.1 % à 37 °C. La lame est séchée par centrifugation pendant 3 min à 100xg puis en la plaçant 5 min à 37 °C.

La lecture de la fluorescence résiduelle est réalisée au moyen du scanner décrit précédemment. Pour visualiser la fluorescence du Cy3, le laser est réglé sur la longueur d'onde 532 nm. La fluorescence totale de chaque spot est quantifiée et une normalisation est ensuite effectuée sur les données. La normalisation des données d'excision n'utilise pas l'application *Normalize It*, à la différence des données obtenues avec la puce plasmide. La **figure 69** présente l'ensemble des opérations réalisées pour normaliser les données et obtenir des taux de coupure pour chaque lysat et chaque lésion considérés. Par souci de clarté, les résultats ne sont pas présentés pour toutes les lésions. Ainsi, les intensités de fluorescence obtenues pour un même lysat déposé généralement en deux endroits de la lame sont tout d'abord moyennées (**figure 69 A**). Nous pouvons voir que les niveaux de fluorescence obtenus avec les pavés sans lysat (0 µg/mL) ne sont pas tous équivalents. Par exemple, le niveau de fluorescence obtenu pour l'ODN EthdA est supérieur à celui obtenu avec l'ODN témoin. Afin de pouvoir comparer les activités d'incision pour les différentes lésions, il est donc nécessaire de ramener au même niveau (100 %) les différentes intensités de fluorescence

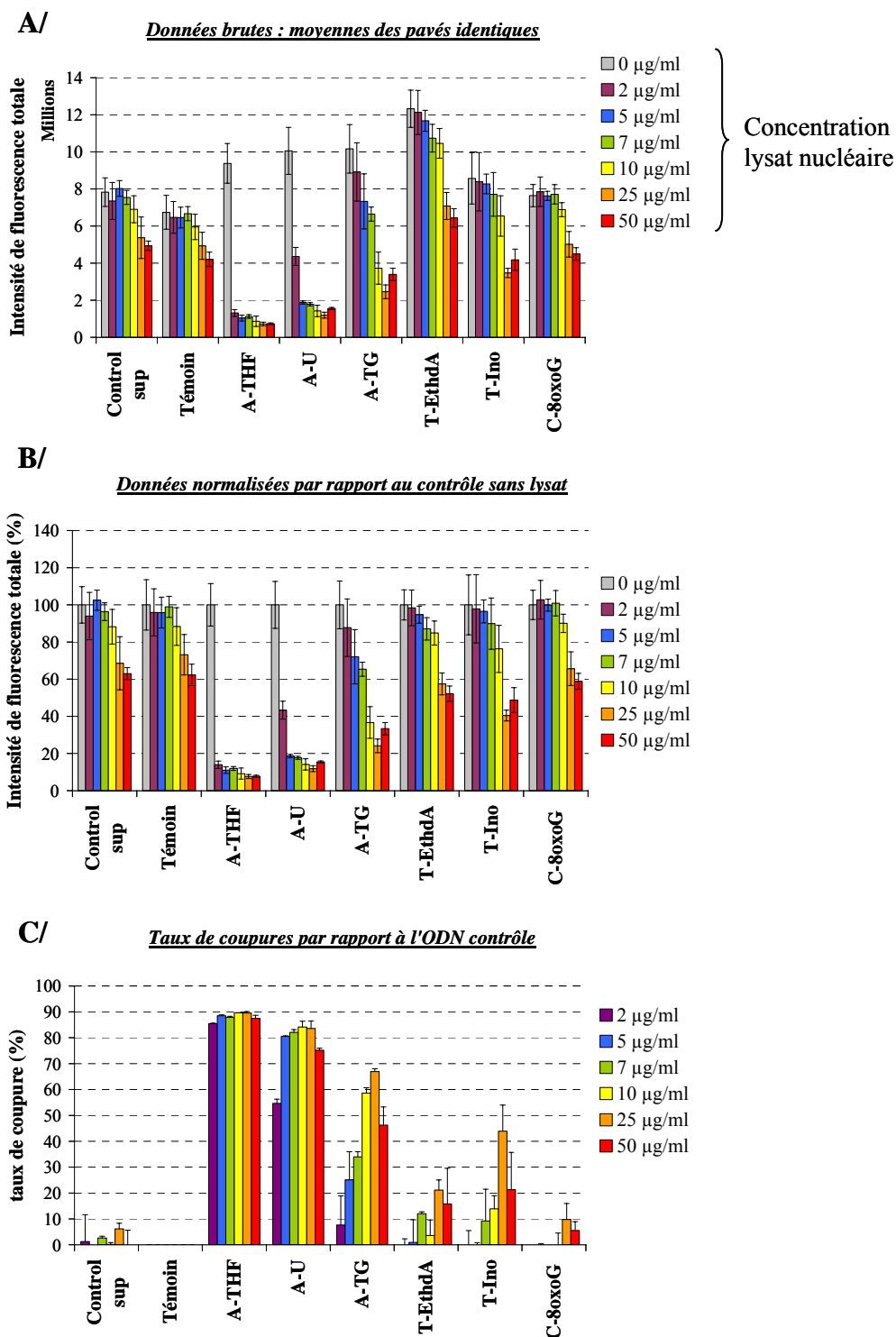


Figure 69: Principe de la normalisation des données obtenues avec la puce oligo

A/ Moyenne des intensités de fluorescence pour tous les ODN de la lame

B/ Expression de l'intensité de fluorescence par rapport au 100% de fluorescence fixé pour le contrôle sans lysat

C/ Calcul des taux de coupure (rapport des intensités de fluorescence obtenues pour l'ODN X et l'ODN témoin)

obtenues pour les différents ODN avec le mélange dépourvu de lysat cellulaire. Un facteur correctif est alors appliqué à toutes les valeurs d'intensité de fluorescence (**Figure 69 B/**). Enfin des taux de coupure de chaque ODN « lésions » sont calculés (**Figure 69 C/**) en faisant le rapport des intensités obtenues en B/ pour l'ODN lésions considéré et l'ODN témoin. Par exemple le calcul du taux de coupure du diol de thymine (A-TG) correspond à :

$$[1 - (I^{A-TG} \text{ après normalisation B/}) / (I^{\text{Témoin}} \text{ après normalisation B/})] * 100.$$

Références bibliographiques

- Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protic, M., Hubscher, U., Egly, J. M. and Wood, R. D. (1995). "Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components" *Cell*, **80**, 859-68.
- Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases" *Genes Dev*, **15**, 2177-96.
- Abrahams, P. J. and Van der Eb, A. J. (1976). "Host-cell reactivation of ultraviolet-irradiated SV40 DNA in five complementation groups of xeroderma pigmentosum" *Mutat Res*, **35**, 13-22.
- Adimoolam, S. and Ford, J. M. (2002). "p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12985-90.
- Allinson, S. L., Dianova, II and Dianov, G. L. (2003). "Poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair: always engaged, but not essential for DNA damage processing" *Acta Biochim Pol*, **50**, 169-79.
- Almeida, K. H. and Sobol, R. W. (2007). "A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification" *DNA Repair (Amst)*, **6**, 695-711.
- Andrews, A. D., Barrett, S. F., Yoder, F. W. and Robbins, J. H. (1978). "Cockayne's syndrome fibroblasts have increased sensitivity to ultraviolet light but normal rates of unscheduled DNA synthesis" *J Invest Dermatol*, **70**, 237-9.
- Araki, M., Masutani, C., Maekawa, T., Watanabe, Y., Yamada, A., Kusumoto, R., Sakai, D., Sugawara, K., Ohkuma, Y. and Hanaoka, F. (2000). "Reconstitution of damage DNA excision reaction from SV40 minichromosomes with purified nucleotide excision repair proteins" *Mutat Res*, **459**, 147-60.
- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugawara, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y. and Hanaoka, F. (2001). "Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair" *J Biol Chem*, **276**, 18665-72.
- Arase, S., Kozuka, T., Tanaka, K., Ikenaga, M. and Takebe, H. (1979). "A sixth complementation group in xeroderma pigmentosum" *Mutat Res*, **59**, 143-6.
- Araujo, S. J., Nigg, E. A. and Wood, R. D. (2001). "Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome" *Mol Cell Biol*, **21**, 2281-91.
- Araujo, S. J., Tirode, F., Coin, F., Pospiech, H., Syvaaja, J. E., Stucki, M., Hubscher, U., Egly, J. M. and Wood, R. D. (2000). "Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK" *Genes Dev*, **14**, 349-59.
- Arbault, S., Sojic, N., Bruce, D., Amatore, C., Sarasin, A. and Vuillaume, M. (2004). "Oxidative stress in cancer prone xeroderma pigmentosum fibroblasts. Real-time and single cell monitoring of superoxide and nitric oxide production with microelectrodes" *Carcinogenesis*, **25**, 509-15.
- Asahina, H., Kuraoka, I., Shirakawa, M., Morita, E. H., Miura, N., Miyamoto, I., Ohtsuka, E., Okada, Y. and Tanaka, K. (1994). "The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA damage" *Mutat Res*, **315**, 229-37.
- Athar, M., Kim, A. L., Ahmad, N., Mukhtar, H., Gautier, J. and Bickers, D. R. (2000). "Mechanism of ultraviolet B-induced cell cycle arrest in G2/M phase in immortalized skin keratinocytes with defective p53" *Biochem Biophys Res Commun*, **277**, 107-11.
- Athas, W. F., Hedayati, M. A., Matanoski, G. M., Farmer, E. R. and Grossman, L. (1991). "Development and field-test validation of an assay for DNA repair in circulating human lymphocytes" *Cancer Res*, **51**, 5786-93.

- Averbeck, D. (2000). "[Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes]" *Cancer Radiother*, **4**, 335-54.
- Balajee, A. S. and Bohr, V. A. (2000). "Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair" *Gene*, **250**, 15-30.
- Bar, J., Cohen-Noyman, E., Geiger, B. and Oren, M. (2004). "Attenuation of the p53 response to DNA damage by high cell density" *Oncogene*, **23**, 2128-37.
- Barret, J. M., Calsou, P., Laurent, G. and Salles, B. (1996). "DNA repair activity in protein extracts of fresh human malignant lymphoid cells" *Mol Pharmacol*, **49**, 766-71.
- Bartels, C. L. and Lambert, M. W. (2007). "Domains in the XPA protein important in its role as a processivity factor" *Biochem Biophys Res Commun*, **356**, 219-25.
- Batty, D., Rasic-Otrin, V., Levine, A. S. and Wood, R. D. (2000a). "Stable binding of human XPC complex to irradiated DNA confers strong discrimination for damaged sites" *J Mol Biol*, **300**, 275-90.
- Batty, D. P. and Wood, R. D. (2000b). "Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA" *Gene*, **241**, 193-204.
- Bebenek, K., Tissier, A., Frank, E. G., McDonald, J. P., Prasad, R., Wilson, S. H., Woodgate, R. and Kunkel, T. A. (2001). "5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase ϵ in vitro" *Science*, **291**, 2156-9.
- Berg, R. J., de Vries, A., van Steeg, H. and de Gruijl, F. R. (1997). "Relative susceptibilities of XPA knockout mice and their heterozygous and wild-type littermates to UVB-induced skin cancer" *Cancer Res*, **57**, 581-4.
- Bernardes de Jesus, B. M., Bjoras, M., Coin, F. and Egly, J. M. (2008). "Dissection of the molecular defects caused by pathogenic mutations in the DNA repair factor XPC" *Mol Cell Biol*, **28**, 7225-35.
- Bessho, T. (1999). "Nucleotide excision repair 3' endonuclease XPG stimulates the activity of base excision repair enzyme thymine glycol DNA glycosylase" *Nucleic Acids Res*, **27**, 979-83.
- Bessho, T., Mu, D. and Sancar, A. (1997). "Initiation of DNA interstrand cross-link repair in humans: the nucleotide excision repair system makes dual incisions 5' to the cross-linked base and removes a 22- to 28-nucleotide-long damage-free strand" *Mol Cell Biol*, **17**, 6822-30.
- Biard, D. S., Despras, E., Sarasin, A. and Angulo, J. F. (2005). "Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing" *Mol Cancer Res*, **3**, 519-29.
- Boiteux, S. and Radicella, J. P. (2000). "The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis" *Arch Biochem Biophys*, **377**, 1-8.
- Bomgarden, R. D., Lupardus, P. J., Soni, D. V., Yee, M. C., Ford, J. M. and Cimprich, K. A. (2006). "Opposing effects of the UV lesion repair protein XPA and UV bypass polymerase η on ATR checkpoint signaling" *Embo J*, **25**, 2605-14.
- Bootsma, D., Mulder, M. P., Cohen, J. A. and Pot, F. (1970). "Different inherited levels of DNA repair replication in xeroderma pigmentosum cell strains after exposure to ultraviolet irradiation" *Mutat Res*, **9**, 507-16.
- Bowman, K. K., Sicard, D. M., Ford, J. M. and Hanawalt, P. C. (2000). "Reduced global genomic repair of ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in simian virus 40-transformed human cells" *Mol Carcinog*, **29**, 17-24.
- Boyce, R. P. and Howard-Flanders, P. (1964). "Release Of Ultraviolet Light-Induced Thymine Dimers From Dna In E. Coli K-12" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **51**, 293-300.
- Branham, W. S., Melvin, C. D., Han, T., Desai, V. G., Moland, C. L., Scully, A. T. and Fuscoe, J. C. (2007). "Elimination of laboratory ozone leads to a dramatic improvement

- in the reproducibility of microarray gene expression measurements" *BMC Biotechnol*, **7**, 8.
- Branum, M. E., Reardon, J. T. and Sancar, A. (2001). "DNA repair excision nuclease attacks undamaged DNA. A potential source of spontaneous mutations" *J Biol Chem*, **276**, 25421-6.
- Bravard, A., Hoffschir, F., Ricoul, M., Cassingena, R., Estrade, S., Luccioni, C. and Dutrillaux, B. (1993). "Alterations of the glutathione cycle enzymes during and after SV40-transformation of human fibroblasts" *Carcinogenesis*, **14**, 21-4.
- Bravard, A., Vacher, M., Moritz, E., Vaslin, L., Hall, J., Epe, B. and Radicella, J. P. (2009). "Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity" *Cancer Res*, **69**, 3642-9.
- Bridges, B. A. (1998). "UV-induced mutations and skin cancer: how important is the link?" *Mutat Res*, **422**, 23-30.
- Burns, J. L., Guzder, S. N., Sung, P., Prakash, S. and Prakash, L. (1996). "An affinity of human replication protein A for ultraviolet-damaged DNA" *J Biol Chem*, **271**, 11607-10.
- Buterin, T., Meyer, C., Giese, B. and Naegeli, H. (2005). "DNA quality control by conformational readout on the undamaged strand of the double helix" *Chem Biol*, **12**, 913-22.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D. and Ravanat, J. L. (2003). "Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features" *Mutat Res*, **531**, 5-23.
- Cadet, J., Sage, E. and Douki, T. (2005). "Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA" *Mutat Res*, **571**, 3-17.
- Calsou, P., Frit, P., Bozzato, C. and Salles, B. (1996a). "Negative interference of metal (II) ions with nucleotide excision repair in human cell-free extracts" *Carcinogenesis*, **17**, 2779-82.
- Calsou, P., Frit, P. and Salles, B. (1996b). "Double strand breaks in DNA inhibit nucleotide excision repair in vitro" *J Biol Chem*, **271**, 27601-7.
- Calsou, P. and Salles, B. (1994). "Properties of damage-dependent DNA incision by nucleotide excision repair in human cell-free extracts" *Nucleic Acids Res*, **22**, 4937-42.
- Camenisch, U., Dip, R., Vitanescu, M. and Naegeli, H. (2007). "Xeroderma pigmentosum complementation group A protein is driven to nucleotide excision repair sites by the electrostatic potential of distorted DNA" *DNA Repair (Amst)*, **6**, 1819-28.
- Cappelli, E., Degan, P. and Frosina, G. (2000). "Comparative repair of the endogenous lesions 8-oxo-7, 8-dihydroguanine (8-oxoG), uracil and abasic site by mammalian cell extracts: 8-oxoG is poorly repaired by human cell extracts" *Carcinogenesis*, **21**, 1135-41.
- Carreau, M., Eveno, E., Quilliet, X., Chevalier-Lagente, O., Benoit, A., Tanganelli, B., Stefanini, M., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., Sarasin, A. and et al. (1995). "Development of a new easy complementation assay for DNA repair deficient human syndromes using cloned repair genes" *Carcinogenesis*, **16**, 1003-9.
- Carvalho, H., da Costa, R. M., Chigancas, V., Weinlich, R., Brumatti, G., Amarante-Mendes, G. P., Sarasin, A. and Menck, C. F. (2003). "Effect of cell confluence on ultraviolet light apoptotic responses in DNA repair deficient cells" *Mutat Res*, **544**, 159-66.
- Carvalho, H., Ortolan, T. G., Depaula, T., Leite, R. A., Weinlich, R., Amarante-Mendes, G. P. and Menck, C. F. (2008). "Sustained activation of p53 in confluent nucleotide excision repair-deficient cells resistant to ultraviolet-induced apoptosis" *DNA Repair (Amst)*, **7**, 922-31.
- Chaturvedi, V., Qin, J. Z., Denning, M. F., Choubey, D., Diaz, M. O. and Nickoloff, B. J. (1999). "Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes" *J Biol Chem*, **274**, 23358-67.

- Chigancas, V., Miyaji, E. N., Muotri, A. R., de Fatima Jacysyn, J., Amarante-Mendes, G. P., Yasui, A. and Menck, C. F. (2000). "Photorepair prevents ultraviolet-induced apoptosis in human cells expressing the marsupial photolyase gene" *Cancer Res*, **60**, 2458-63.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P. and Kaina, B. (2003). "Mechanisms of human DNA repair: an update" *Toxicology*, **193**, 3-34.
- Cimprich, K. A. and Cortez, D. (2008). "ATR: an essential regulator of genome integrity" *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 616-27.
- Cleaver, J. E. (1968). "Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum" *Nature*, **218**, 652-6.
- Cleaver, J. E. (2005). "Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair" *Nat Rev Cancer*, **5**, 564-73.
- Cleaver, J. E. (1972). "Xeroderma pigmentosum: variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light" *J Invest Dermatol*, **58**, 124-8.
- Cleaver, J. E., Charles, W. C., McDowell, M. L., Sadinski, W. J. and Mitchell, D. L. (1995). "Overexpression of the XPA repair gene increases resistance to ultraviolet radiation in human cells by selective repair of DNA damage" *Cancer Res*, **55**, 6152-60.
- Cleaver, J. E. and States, J. C. (1997). "The DNA damage-recognition problem in human and other eukaryotic cells: the XPA damage binding protein" *Biochem J*, **328 (Pt 1)**, 1-12.
- Costa, R. M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., Carvalho, H. and Menck, C. F. (2003). "The eukaryotic nucleotide excision repair pathway" *Biochimie*, **85**, 1083-99.
- Coudore, F., Calsou, P. and Salles, B. (1997). "DNA repair activity in protein extracts from rat tissues" *FEBS Lett*, **414**, 581-4.
- Courdavault, S., Baudouin, C., Charveron, M., Canguilhem, B., Favier, A., Cadet, J. and Douki, T. (2005). "Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations" *DNA Repair (Amst)*, **4**, 836-44.
- Courdavault, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J. and Douki, T. (2004a). "Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells" *Mutat Res*, **556**, 135-42.
- Courdavault, S., Baudouin, C., Sauvaigo, S., Mouret, S., Candeias, S., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J. and Douki, T. (2004b). "Unrepaired cyclobutane pyrimidine dimers do not prevent proliferation of UV-B-irradiated cultured human fibroblasts" *Photochem Photobiol*, **79**, 145-51.
- Couve-Privat, S., Mace, G., Rosselli, F. and Saparbaev, M. K. (2007). "Psoralen-induced DNA adducts are substrates for the base excision repair pathway in human cells" *Nucleic Acids Res*, **35**, 5672-82.
- D'Errico, M., Parlanti, E. and Dogliotti, E. (2007a). "Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology" *Mutat Res*, **659**, 4-14.
- D'Errico, M., Parlanti, E., Teson, M., de Jesus, B. M., Degan, P., Calcagnile, A., Jaruga, P., Bjoras, M., Crescenzi, M., Pedrini, A. M., Egly, J. M., Zambruno, G., Stefanini, M., Dizdaroglu, M. and Dogliotti, E. (2006). "New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage" *Embo J*, **25**, 4305-15.
- D'Errico, M., Parlanti, E., Teson, M., Degan, P., Lemma, T., Calcagnile, A., Iavarone, I., Jaruga, P., Ropolo, M., Pedrini, A. M., Orioli, D., Frosina, G., Zambruno, G., Dizdaroglu, M., Stefanini, M. and Dogliotti, E. (2007b). "The role of CSA in the response to oxidative DNA damage in human cells" *Oncogene*, **26**, 4336-43.
- da Costa, R. M., Quayle, C., de Fatima Jacysyn, J., Amarante-Mendes, G. P., Sarasin, A. and Menck, C. F. (2008). "Resistance to ultraviolet-induced apoptosis in DNA repair deficient growth arrested human fibroblasts is not related to recovery from RNA transcription blockage" *Mutat Res*, **640**, 1-7.

- Dahm, R. (2005). "Friedrich Miescher and the discovery of DNA" *Dev Biol*, **278**, 274-88.
- Das, A., Wiederhold, L., Leppard, J. B., Kedar, P., Prasad, R., Wang, H., Boldogh, I., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M., Tomkinson, A. E., Wilson, S. H., Mitra, S. and Hazra, T. K. (2006). "NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: Evidence for a repair complex in human cells" *DNA Repair (Amst)*, **5**, 1439-48.
- Datta, A., Bagchi, S., Nag, A., Shiyanov, P., Adami, G. R., Yoon, T. and Raychaudhuri, P. (2001). "The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase" *Mutat Res*, **486**, 89-97.
- Daya-Grosjean, L., Dumaz, N. and Sarasin, A. (1995). "The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers" *J Photochem Photobiol B*, **28**, 115-24.
- Daya-Grosjean, L. and Sarasin, A. (2005). "The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors" *Mutat Res*, **571**, 43-56.
- de Boer, J. and Hoeijmakers, J. H. (2000). "Nucleotide excision repair and human syndromes" *Carcinogenesis*, **21**, 453-60.
- de Laat, W. L., Appeldoorn, E., Sugawara, K., Weterings, E., Jaspers, N. G. and Hoeijmakers, J. H. (1998). "DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair" *Genes Dev*, **12**, 2598-609.
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G. and Hoeijmakers, J. H. (1999). "Molecular mechanism of nucleotide excision repair" *Genes Dev*, **13**, 768-85.
- de Vries, A. and van Steeg, H. (1996). "Xpa knockout mice" *Semin Cancer Biol*, **7**, 229-40.
- de Waard, H., de Wit, J., Andressoo, J. O., van Oostrom, C. T., Riis, B., Weimann, A., Poulsen, H. E., van Steeg, H., Hoeijmakers, J. H. and van der Horst, G. T. (2004). "Different effects of CSA and CSB deficiency on sensitivity to oxidative DNA damage" *Mol Cell Biol*, **24**, 7941-8.
- de Waard, H., Sonneveld, E., de Wit, J., Esveltd-van Lange, R., Hoeijmakers, J. H., Vrieling, H. and van der Horst, G. T. (2008). "Cell-type-specific consequences of nucleotide excision repair deficiencies: Embryonic stem cells versus fibroblasts" *DNA Repair (Amst)*, **7**, 1659-69.
- Demple, B., Herman, T. and Chen, D. S. (1991). "Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 11450-4.
- Demple, B. and Linn, S. (1982). "On the recognition and cleavage mechanism of Escherichia coli endodeoxyribonuclease V, a possible DNA repair enzyme" *J Biol Chem*, **257**, 2848-55.
- Dianov, G., Bischoff, C., Piotrowski, J. and Bohr, V. A. (1998). "Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts" *J Biol Chem*, **273**, 33811-6.
- Dianov, G. L. (2003). "Monitoring base excision repair by in vitro assays" *Toxicology*, **193**, 35-41.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. and Roeder, R. G. (1983). "Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei" *Nucleic Acids Res*, **11**, 1475-89.
- Dijt, F. J., Fichtinger-Schepman, A. M., Berends, F. and Reedijk, J. (1988). "Formation and repair of cisplatin-induced adducts to DNA in cultured normal and repair-deficient human fibroblasts" *Cancer Res*, **48**, 6058-62.
- Dobrucki, J. W., Feret, D. and Noatynska, A. (2007). "Scattering of exciting light by live cells in fluorescence confocal imaging: phototoxic effects and relevance for FRAP studies" *Biophys J*, **93**, 1778-86.

- Doherty, A. J., Serpell, L. C. and Ponting, C. P. (1996). "The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA" *Nucleic Acids Res*, **24**, 2488-97.
- Dou, H., Mitra, S. and Hazra, T. K. (2003). "Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2" *J Biol Chem*, **278**, 49679-84.
- Douki, T., Perdiz, D., Grof, P., Kuluncsics, Z., Moustacchi, E., Cadet, J. and Sage, E. (1999). "Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role" *Photochem Photobiol*, **70**, 184-90.
- Dunkern, T. R., Fritz, G. and Kaina, B. (2001). "Ultraviolet light-induced DNA damage triggers apoptosis in nucleotide excision repair-deficient cells via Bcl-2 decline and caspase-3/-8 activation" *Oncogene*, **20**, 6026-38.
- Dunkern, T. R. and Kaina, B. (2002). "Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide excision repair-deficient Chinese hamster cells" *Mol Biol Cell*, **13**, 348-61.
- Dusinska, M., Dzupinkova, Z., Wsolova, L., Harrington, V. and Collins, A. R. (2006). "Possible involvement of XPA in repair of oxidative DNA damage deduced from analysis of damage, repair and genotype in a human population study" *Mutagenesis*, **21**, 205-11.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" *Nature*, **411**, 494-8.
- Evans, E., Moggs, J. G., Hwang, J. R., Egly, J. M. and Wood, R. D. (1997). "Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors" *Embo J*, **16**, 6559-73.
- Fanning, E., Klimovich, V. and Nager, A. R. (2006). "A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways" *Nucleic Acids Res*, **34**, 4126-37.
- Fearon, E. R. and Vogelstein, B. (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis" *Cell*, **61**, 759-67.
- Feng, S., Parrish, D. D. and Lambert, M. W. (1997). "A processive versus a distributive mechanism of action correlates with differences in ability of normal and xeroderma pigmentosum group A endonucleases to incise damaged nucleosomal DNA" *Carcinogenesis*, **18**, 279-86.
- Feuerhahn, S. and Egly, J. M. (2008). "Tools to study DNA repair: what's in the box?" *Trends Genet*, **24**, 467-74.
- Fitch, M. E., Nakajima, S., Yasui, A. and Ford, J. M. (2003). "In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product" *J Biol Chem*, **278**, 46906-10.
- Ford, J. M. (2005). "Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53" *Mutat Res*, **577**, 195-202.
- Ford, J. M. and Hanawalt, P. C. (1997). "Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts" *J Biol Chem*, **272**, 28073-80.
- Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O. M., Laval, J. and Dogliotti, E. (1999). "The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells" *J Biol Chem*, **274**, 15230-6.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D'Errico, M., Simonelli, V. and Dogliotti, E. (2003a). "The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility" *Biochimie*, **85**, 1053-71.

- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D'Errico, M., Simonelli, V. and Dogliotti, E. (2003b). "8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways" *Mutat Res*, **531**, 127-39.
- Francis, M. A. and Rainbow, A. J. (1999). "UV-enhanced reactivation of a UV-damaged reporter gene suggests transcription-coupled repair is UV-inducible in human cells" *Carcinogenesis*, **20**, 19-26.
- Franklin, R. E. and Gosling, R. G. (1953). "Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate" *Nature*, **172**, 156-7.
- Friedberg, E. C. (2001). "How nucleotide excision repair protects against cancer" *Nat Rev Cancer*, **1**, 22-33.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A. and Ellenberger, T. (2006). "DNA Repair and Mutagenesis" *ASM Press*, **Second edition**, 1-1118.
- Fung, M. K., Han, H. Y., Leung, S. C., Cheung, H. W., Cheung, A. L., Wong, Y. C., Ling, M. T. and Wang, X. (2008). "MAD2 Interacts with DNA Repair Proteins and Negatively Regulates DNA Damage Repair" *J Mol Biol*, **381**, 24-34.
- Gabrielli, B. G., Clark, J. M., McCormack, A. K. and Ellem, K. A. (1997). "Ultraviolet light-induced G2 phase cell cycle checkpoint blocks cdc25-dependent progression into mitosis" *Oncogene*, **15**, 749-58.
- Galloway, A. M., Liuzzi, M. and Paterson, M. C. (1994). "Metabolic processing of cyclobutyl pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts in UV-treated human cells. Evidence for distinct excision-repair pathways" *J Biol Chem*, **269**, 974-80.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T. A. and Blanco, L. (2001). "Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase lambda: a possible role in base excision repair" *J Biol Chem*, **276**, 34659-63.
- Garcia, A., Lambert, I. B. and Fuchs, R. P. (1993). "DNA adduct-induced stabilization of slipped frameshift intermediates within repetitive sequences: implications for mutagenesis" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5989-93.
- Gentile, M., Latonen, L. and Laiho, M. (2003). "Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses" *Nucleic Acids Res*, **31**, 4779-90.
- Georgaki, A., Strack, B., Podust, V. and Hubscher, U. (1992). "DNA unwinding activity of replication protein A" *FEBS Lett*, **308**, 240-4.
- Giglia-Mari, G., Coin, F., Ranish, J. A., Hoogstraten, D., Theil, A., Wijgers, N., Jaspers, N. G., Raams, A., Argentini, M., van der Spek, P. J., Botta, E., Stefanini, M., Egly, J. M., Aebersold, R., Hoeijmakers, J. H. and Vermeulen, W. (2004). "A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A" *Nat Genet*, **36**, 714-9.
- Gillet, L. C. and Scharer, O. D. (2006). "Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair" *Chem Rev*, **106**, 253-76.
- Gros, L., Saparbaev, M. K. and Laval, J. (2002). "Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage" *Oncogene*, **21**, 8905-25.
- Gruskin, E. A. and Lloyd, R. S. (1986). "The DNA scanning mechanism of T4 endonuclease V. Effect of NaCl concentration on processive nicking activity" *J Biol Chem*, **261**, 9607-13.
- Guerniou, V., Rapin, D., Millau, J. F., Bufflier, E., Favier, A., Cadet, J. and Sauvaigo, S. (2005). "Repair of oxidative damage of thymine by HeLa whole-cell extracts: simultaneous analysis using a microsupport and comparison with traditional PAGE analysis" *Biochimie*, **87**, 151-9.

- Gunz, D., Hess, M. T. and Naegeli, H. (1996). "Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair. Evidence for a thermodynamic probing mechanism" *J Biol Chem*, **271**, 25089-98.
- Guzder, S. N., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S. (1995). "Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIH" *J Biol Chem*, **270**, 12973-6.
- Guzder, S. N., Sung, P., Prakash, L. and Prakash, S. (1996). "Nucleotide excision repair in yeast is mediated by sequential assembly of repair factors and not by a pre-assembled repairosome" *J Biol Chem*, **271**, 8903-10.
- Hanawalt, P. C. (2000). "DNA repair. The bases for Cockayne syndrome" *Nature*, **405**, 415-6.
- Hanawalt, P. C. and Spivak, G. (2008). "Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises" *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 958-70.
- Hang, B., Chenna, A., Fraenkel-Conrat, H. and Singer, B. (1996). "An unusual mechanism for the major human apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease involving 5' cleavage of DNA containing a benzene-derived exocyclic adduct in the absence of an AP site" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13737-41.
- Hansson, J., Grossman, L., Lindahl, T. and Wood, R. D. (1990). "Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair synthesis defect with Escherichia coli UvrABC proteins in a cell-free system" *Nucleic Acids Res*, **18**, 35-40.
- Hansson, J. and Wood, R. D. (1989). "Repair synthesis by human cell extracts in DNA damaged by cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II)" *Nucleic Acids Res*, **17**, 8073-91.
- Hayashi, M., Araki, S., Kohyama, J., Shioda, K. and Fukatsu, R. (2005). "Oxidative nucleotide damage and superoxide dismutase expression in the brains of xeroderma pigmentosum group A and Cockayne syndrome" *Brain Dev*, **27**, 34-8.
- Hazra, T. K., Das, A., Das, S., Choudhury, S., Kow, Y. W. and Roy, R. (2007). "Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective" *DNA Repair (Amst)*, **6**, 470-80.
- He, Z., Henricksen, L. A., Wold, M. S. and Ingles, C. J. (1995). "RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair" *Nature*, **374**, 566-9.
- He, Z. and Ingles, C. J. (1997). "Isolation of human complexes proficient in nucleotide excision repair" *Nucleic Acids Res*, **25**, 1136-41.
- Hegde, M. L., Hazra, T. K. and Mitra, S. (2008). "Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells" *Cell Res*, **18**, 27-47.
- Herceg, Z. and Wang, Z. Q. (2001). "Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death" *Mutat Res*, **477**, 97-110.
- Hermanson-Miller, I. L. and Turchi, J. J. (2002). "Strand-specific binding of RPA and XPA to damaged duplex DNA" *Biochemistry*, **41**, 2402-8.
- Herzinger, T., Funk, J. O., Hillmer, K., Eick, D., Wolf, D. A. and Kind, P. (1995). "Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the cdc2 cell cycle kinase" *Oncogene*, **11**, 2151-6.
- Hess, M. T., Gunz, D. and Naegeli, H. (1996). "A repair competition assay to assess recognition by human nucleotide excision repair" *Nucleic Acids Res*, **24**, 824-8.
- Hess, M. T., Schwitter, U., Petretta, M., Giese, B. and Naegeli, H. (1997a). "Bipartite substrate discrimination by human nucleotide excision repair" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6664-9.
- Hess, R. D. and Brandner, G. (1997b). "DNA-damage-inducible p53 activity in SV40-transformed cells" *Oncogene*, **15**, 2501-4.

- Hill, J. W., Hazra, T. K., Izumi, T. and Mitra, S. (2001). "Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair" *Nucleic Acids Res*, **29**, 430-8.
- Hoffschir, F., Daya-Grosjean, L., Petit, P. X., Nocentini, S., Dutrillaux, B., Sarasin, A. and Vuillaume, M. (1998). "Low catalase activity in xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40-transformed human cell lines is directly related to decreased intracellular levels of the cofactor, NADPH" *Free Radic Biol Med*, **24**, 809-16.
- Hoffschir, F., Vuillaume, M., Sabatier, L., Ricoul, M., Daya-Grosjean, L., Estrade, S., Cassingena, R., Calvayrac, R., Sarasin, A. and Dutrillaux, B. (1993). "Decrease in catalase activity and loss of the 11p chromosome arm in the course of SV40 transformation of human fibroblasts" *Carcinogenesis*, **14**, 1569-72.
- Hoogstraten, D., Bergink, S., Ng, J. M., Verbiest, V. H., Luijsterburg, M. S., Geverts, B., Raams, A., Dinant, C., Hoeijmakers, J. H., Vermeulen, W. and Houtsmuller, A. B. (2008). "Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC" *J Cell Sci*, **121**, 2850-9.
- Houtgraaf, J. H., Versmissen, J. and van der Giessen, W. J. (2006). "A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells" *Cardiovasc Revasc Med*, **7**, 165-72.
- Hu, J., Imam, S. Z., Hashiguchi, K., de Souza-Pinto, N. C. and Bohr, V. A. (2005). "Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase (alpha-OGG1) modulates its function" *Nucleic Acids Res*, **33**, 3271-82.
- Huang, J. C., Hsu, D. S., Kazantsev, A. and Sancar, A. (1994a). "Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12213-7.
- Huang, J. C. and Sancar, A. (1994b). "Determination of minimum substrate size for human excinuclease" *J Biol Chem*, **269**, 19034-40.
- Huang, J. C., Svoboda, D. L., Reardon, J. T. and Sancar, A. (1992). "Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3664-8.
- Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C. and Chu, G. (1999). "Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 424-8.
- Ischenko, A. A. and Saporbaev, M. K. (2002). "Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage" *Nature*, **415**, 183-7.
- Ito, K., Inoue, S., Yamamoto, K. and Kawanishi, S. (1993). "8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin" *J Biol Chem*, **268**, 13221-7.
- Itoh, M., Hayashi, M., Shioda, K., Minagawa, M., Isa, F., Tamagawa, K., Morimatsu, Y. and Oda, M. (1999). "Neurodegeneration in hereditary nucleotide repair disorders" *Brain Dev*, **21**, 326-33.
- Jaiswal, M., Lipinski, L. J., Bohr, V. A. and Mazur, S. J. (1998). "Efficient in vitro repair of 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine by human cell extracts: involvement of multiple pathways" *Nucleic Acids Res*, **26**, 2184-91.
- Jayaraman, L., Murthy, K. G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S. and Prives, C. (1997). "Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53" *Genes Dev*, **11**, 558-70.
- Jazzar, M. M. and Naseem, I. (1996). "Genotoxicity of photoilluminated riboflavin in the presence of Cu(II)" *Free Radic Biol Med*, **21**, 7-14.

- Jiang, G. and Sancar, A. (2006). "Recruitment of DNA damage checkpoint proteins to damage in transcribed and nontranscribed sequences" *Mol Cell Biol*, **26**, 39-49.
- Jiang, M., Axe, T., Holgate, R., Rubbi, C. P., Okorokov, A. L., Mee, T. and Milner, J. (2001). "p53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding involves the proline-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress" *Oncogene*, **20**, 5449-58.
- Jing, Y., Kao, J. F. and Taylor, J. S. (1998). "Thermodynamic and base-pairing studies of matched and mismatched DNA dodecamer duplexes containing cis-syn, (6-4) and Dewar photoproducts of TT" *Nucleic Acids Res*, **26**, 3845-53.
- Jones, C. J., Cleaver, J. E. and Wood, R. D. (1992). "Repair of damaged DNA by extracts from a xeroderma pigmentosum complementation group A revertant and expression of a protein absent in its parental cell line" *Nucleic Acids Res*, **20**, 991-5.
- Jones, C. J. and Wood, R. D. (1993). "Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA" *Biochemistry*, **32**, 12096-104.
- Joubert, A. and Foray, N. (2007). "[Intrinsic radiosensitivity and DNA double-strand breaks in human cells]" *Cancer Radiother*, **11**, 129-42.
- Kannouche, P. and Sary, A. (2003). "Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases" *Biochimie*, **85**, 1123-32.
- Kappes, U. P., Luo, D., Potter, M., Schulmeister, K. and Runger, T. M. (2006). "Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells" *J Invest Dermatol*, **126**, 667-75.
- Kassam, S. N. and Rainbow, A. J. (2009). "UV-inducible base excision repair of oxidative damaged DNA in human cells" *Mutagenesis*, **24**, 75-83.
- Kassam, S. N. and Rainbow, A. J. (2007). "Deficient base excision repair of oxidative DNA damage induced by methylene blue plus visible light in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts" *Biochem Biophys Res Commun*, **359**, 1004-9.
- Kathe, S. D., Shen, G. P. and Wallace, S. S. (2004). "Single-stranded breaks in DNA but not oxidative DNA base damages block transcriptional elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts" *J Biol Chem*, **279**, 18511-20.
- Katsumi, S., Kobayashi, N., Imoto, K., Nakagawa, A., Yamashina, Y., Muramatsu, T., Shirai, T., Miyagawa, S., Sugiura, S., Hanaoka, F., Matsunaga, T., Nikaido, O. and Mori, T. (2001). "In situ visualization of ultraviolet-light-induced DNA damage repair in locally irradiated human fibroblasts" *J Invest Dermatol*, **117**, 1156-61.
- Kazantsev, A., Mu, D., Nichols, A. F., Zhao, X., Linn, S. and Sancar, A. (1996). "Functional complementation of xeroderma pigmentosum complementation group E by replication protein A in an in vitro system" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5014-8.
- Khobta, A., Kitsera, N., Speckmann, B. and Epe, B. (2008). "8-Oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) causes a transcriptional inactivation of damaged DNA in the absence of functional Cockayne syndrome B (Csb) protein" *DNA Repair (Amst)*, **8**, 309-17.
- Kim, J. K. and Choi, B. S. (1995). "The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'-->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement" *Eur J Biochem*, **228**, 849-54.
- Kisby, G. E., Lesselroth, H., Olivas, A., Samson, L., Gold, B., Tanaka, K. and Turker, M. S. (2004). "Role of nucleotide- and base-excision repair in genotoxin-induced neuronal cell death" *DNA Repair (Amst)*, **3**, 617-27.
- Kleijer, W. J., Laugel, V., Berneburg, M., Nardo, T., Fawcett, H., Gratchev, A., Jaspers, N. G., Sarasin, A., Stefanini, M. and Lehmann, A. R. (2008). "Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy" *DNA Repair (Amst)*, **7**, 744-50.
- Klein, J. C., Bleeker, M. J., Saris, C. P., Roelen, H. C., Brugghe, H. F., van den Elst, H., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Westra, J. G., Kriek, E. and et al. (1992). "Repair and

- replication of plasmids with site-specific 8-oxodG and 8-AAFdG residues in normal and repair-deficient human cells" *Nucleic Acids Res*, **20**, 4437-43.
- Klungland, A., Hoss, M., Gunz, D., Constantinou, A., Clarkson, S. G., Doetsch, P. W., Bolton, P. H., Wood, R. D. and Lindahl, T. (1999a). "Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein" *Mol Cell*, **3**, 33-42.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D. E. (1999b). "Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13300-5.
- Kobayashi, T., Takeuchi, S., Saijo, M., Nakatsu, Y., Morioka, H., Otsuka, E., Wakasugi, M., Nikaido, O. and Tanaka, K. (1998). "Mutational analysis of a function of xeroderma pigmentosum group A (XPA) protein in strand-specific DNA repair" *Nucleic Acids Res*, **26**, 4662-8.
- Koberle, B., Masters, J. R., Hartley, J. A. and Wood, R. D. (1999). "Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours" *Curr Biol*, **9**, 273-6.
- Koberle, B., Roginskaya, V. and Wood, R. D. (2006). "XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells" *DNA Repair (Amst)*, **5**, 641-8.
- Kohli, M. and Jorgensen, T. J. (1999). "The influence of SV40 immortalization of human fibroblasts on p53-dependent radiation responses" *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 168-76.
- Koster, M., Frahm, T. and Hauser, H. (2005). "Nucleocytoplasmic shuttling revealed by FRAP and FLIP technologies" *Curr Opin Biotechnol*, **16**, 28-34.
- Kovacs, D., Raffa, S., Flori, E., Aspite, N., Briganti, S., Cardinali, G., Torrisi, M. R. and Picardo, M. (2009). "Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB" *J Dermatol Sci*, **54**, 106-13.
- Kow, Y. W. (2002). "Repair of deaminated bases in DNA" *Free Radic Biol Med*, **33**, 886-93.
- Kraemer, K. H., De Weerd-Kastelein, E. A., Robbins, J. H., Keijzer, W., Barrett, S. F., Petinga, R. A. and Bootsma, D. (1975). "Five complementation groups in xeroderma pigmentosum" *Mutat Res*, **33**, 327-40.
- Kraemer, K. H., Lee, M. M. and Scotto, J. (1987). "Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases" *Arch Dermatol*, **123**, 241-50.
- Krokan, H. E., Standal, R. and Slupphaug, G. (1997). "DNA glycosylases in the base excision repair of DNA" *Biochem J*, **325 (Pt 1)**, 1-16.
- Kruman, II, Schwartz, E., Kruman, Y., Cutler, R. G., Zhu, X., Greig, N. H. and Mattson, M. P. (2004). "Suppression of uracil-DNA glycosylase induces neuronal apoptosis" *J Biol Chem*, **279**, 43952-60.
- Kusumoto, R., Masutani, C., Sugasawa, K., Iwai, S., Araki, M., Uchida, A., Mizukoshi, T. and Hanaoka, F. (2001). "Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro" *Mutat Res*, **485**, 219-27.
- Lachaise, F., Martin, G., Drougard, C., Perl, A., Vuillaume, M., Wegnez, M., Sarasin, A. and Daya-Grosjean, L. (2001). "Relationship between posttranslational modification of transaldolase and catalase deficiency in UV-sensitive repair-deficient xeroderma pigmentosum fibroblasts and SV40-transformed human cells" *Free Radic Biol Med*, **30**, 1365-73.
- Laine, J. P. and Egly, J. M. (2006a). "When transcription and repair meet: a complex system" *Trends Genet*, **22**, 430-6.

- Laine, J. P. and Egly, J. M. (2006b). "Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II" *Embo J*, **25**, 387-97.
- Lambert, M. W. and Yang, L. (2000). "Xeroderma pigmentosum complementation group A protein acts as a processivity factor" *Biochem Biophys Res Commun*, **271**, 782-7.
- Larsen, E., Kwon, K., Coin, F., Egly, J. M. and Klungland, A. (2004). "Transcription activities at 8-oxoG lesions in DNA" *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1457-68.
- Layher, S. K. and Cleaver, J. E. (1997). "Quantification of XPA gene expression levels in human and mouse cell lines by competitive RT-PCR" *Mutat Res*, **383**, 9-19.
- Lee, S. E., Moore, J. K., Holmes, A., Umez, K., Kolodner, R. D. and Haber, J. E. (1998). "Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage" *Cell*, **94**, 399-409.
- Lehmann, A. R. (2005). "Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells" *FEBS Lett*, **579**, 873-6.
- Lehmann, A. R. (2003). "DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy" *Biochimie*, **85**, 1101-11.
- Lehmann, A. R. (2001). "The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases" *Genes Dev*, **15**, 15-23.
- Lehmann, A. R. and Stevens, S. (1980). "A rapid procedure for measurement of DNA repair in human fibroblasts and for complementation analysis of xeroderma pigmentosum cells" *Mutat Res*, **69**, 177-90.
- Leibeling, D., Laspe, P. and Emmert, S. (2006). "Nucleotide excision repair and cancer" *J Mol Histol*, **37**, 225-38.
- Leppard, J. B., Dong, Z., Mackey, Z. B. and Tomkinson, A. E. (2003). "Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair" *Mol Cell Biol*, **23**, 5919-27.
- Levene, P. (1919). "The structure of yeast nucleic acid" *J Biol Chem*, **40**, 415-424.
- Levy, D. D., Saijo, M., Tanaka, K. and Kraemer, K. H. (1995). "Expression of a transfected DNA repair gene (XPA) in xeroderma pigmentosum group A cells restores normal DNA repair and mutagenesis of UV-treated plasmids" *Carcinogenesis*, **16**, 1557-63.
- Li, L., Elledge, S. J., Peterson, C. A., Bales, E. S. and Legerski, R. J. (1994). "Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5012-6.
- Li, L., Lu, X., Peterson, C. A. and Legerski, R. J. (1995a). "An interaction between the DNA repair factor XPA and replication protein A appears essential for nucleotide excision repair" *Mol Cell Biol*, **15**, 5396-402.
- Li, L., Peterson, C. A., Lu, X. and Legerski, R. J. (1995b). "Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nucleotide excision repair" *Mol Cell Biol*, **15**, 1993-8.
- Li, R. Y., Calsou, P., Jones, C. J. and Salles, B. (1998). "Interactions of the transcription/DNA repair factor TFIIH and XP repair proteins with DNA lesions in a cell-free repair assay" *J Mol Biol*, **281**, 211-8.
- Limsirichai, S., Niimi, A., Fawcett, H., Lehmann, A., Yamashita, S. and Ogi, T. (2009). "A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU)" *Nucleic Acids Res*, **37**,
- Lipinski, L. J., Hoehr, N., Mazur, S. J., Dianov, G. L., Senturker, S., Dizdaroglu, M. and Bohr, V. A. (1999). "Repair of oxidative DNA base lesions induced by fluorescent light is defective in xeroderma pigmentosum group A cells" *Nucleic Acids Res*, **27**, 3153-8.

- Liu, Y., Liu, Y., Yang, Z., Utzat, C., Wang, G., Basu, A. K. and Zou, Y. (2005). "Cooperative interaction of human XPA stabilizes and enhances specific binding of XPA to DNA damage" *Biochemistry*, **44**, 7361-8.
- Lo, H. L., Nakajima, S., Ma, L., Walter, B., Yasui, A., Ethell, D. W. and Owen, L. B. (2005). "Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest" *BMC Cancer*, **5**, 135.
- Loeb, L. A., Springgate, C. F. and Battula, N. (1974). "Errors in DNA replication as a basis of malignant changes" *Cancer Res*, **34**, 2311-21.
- Low, G. K., Fok, E. D., Ting, A. P. and Hande, M. P. (2008). "Oxidative damage induced genotoxic effects in human fibroblasts from Xeroderma Pigmentosum group A patients" *Int J Biochem Cell Biol*, **40**, 2583-95.
- Lu, X., Bocangel, D., Nannenga, B., Yamaguchi, H., Appella, E. and Donehower, L. A. (2004). "The p53-induced oncogenic phosphatase PPM1D interacts with uracil DNA glycosylase and suppresses base excision repair" *Mol Cell*, **15**, 621-34.
- Ludlow, J. W. (1993). "Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRB and p53" *Faseb J*, **7**, 866-71.
- Lydall, D. and Whitehall, S. (2005). "Chromatin and the DNA damage response" *DNA Repair (Amst)*, **4**, 1195-207.
- Maillard, O., Camenisch, U., Blagoev, K. B. and Naegeli, H. (2008). "Versatile protection from mutagenic DNA lesions conferred by bipartite recognition in nucleotide excision repair" *Mutat Res*, **658**, 271-86.
- Mantovani, F. and Banks, L. (2001). "The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression" *Oncogene*, **20**, 7874-87.
- Marenstein, D. R., Chan, M. K., Altamirano, A., Basu, A. K., Boorstein, R. J., Cunningham, R. P. and Teebor, G. W. (2003). "Substrate specificity of human endonuclease III (hNTH1). Effect of human APE1 on hNTH1 activity" *J Biol Chem*, **278**, 9005-12.
- Marie, C., Maitre, A., Douki, T., Gateau, M., Tarantini, A., Guiraud, P., Favier, A. and Ravanat, J. L. (2008). "Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts" *J Appl Toxicol*, **28**, 579-90.
- Masuda, Y., Bennett, R. A. and Demple, B. (1998). "Rapid dissociation of human apurinic endonuclease (Ape1) from incised DNA induced by magnesium" *J Biol Chem*, **273**, 30360-5.
- Masutani, C., Araki, M., Yamada, A., Kusumoto, R., Nogimori, T., Maekawa, T., Iwai, S. and Hanaoka, F. (1999). "Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity" *Embo J*, **18**, 3491-501.
- Masutani, C., Sugasawa, K., Asahina, H., Tanaka, K. and Hanaoka, F. (1993). "Cell-free repair of UV-damaged simian virus 40 chromosomes in human cell extracts. II. Defective DNA repair synthesis by xeroderma pigmentosum cell extracts" *J Biol Chem*, **268**, 9105-9.
- Matsumoto, Y. and Kim, K. (1995). "Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair" *Science*, **269**, 699-702.
- Matsumura, Y., Nishigori, C., Yagi, T., Imamura, S. and Takebe, H. (1998). "Characterization of molecular defects in xeroderma pigmentosum group F in relation to its clinically mild symptoms" *Hum Mol Genet*, **7**, 969-74.
- Melis, J. P., Wijnhoven, S. W., Beems, R. B., Roodbergen, M., van den Berg, J., Moon, H., Friedberg, E., van der Horst, G. T., Hoeijmakers, J. H., Vijg, J. and van Steeg, H. (2008). "Mouse models for xeroderma pigmentosum group A and group C show divergent cancer phenotypes" *Cancer Res*, **68**, 1347-53.

- Mellon, I., Bohr, V. A., Smith, C. A. and Hanawalt, P. C. (1986). "Preferential DNA repair of an active gene in human cells" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 8878-82.
- Mer, G., Bochkarev, A., Gupta, R., Bochkareva, E., Frappier, L., Ingles, C. J., Edwards, A. M. and Chazin, W. J. (2000). "Structural basis for the recognition of DNA repair proteins UNG2, XPA, and RAD52 by replication factor RPA" *Cell*, **103**, 449-56.
- Merkle, T. J., O'Brien, K., Brooks, P. J., Tarone, R. E. and Robbins, J. H. (2004). "DNA repair in human fibroblasts, as reflected by host-cell reactivation of a transfected UV-irradiated luciferase gene, is not related to donor age" *Mutat Res*, **554**, 9-17.
- Meselson, M. and Stahl, F. W. (1958). "The Replication Of Dna In Escherichia Coli" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **44**, 671-82.
- Miao, F., Bouziane, M., Dammann, R., Masutani, C., Hanaoka, F., Pfeifer, G. and O'Connor, T. R. (2000). "3-Methyladenine-DNA glycosylase (MPG protein) interacts with human RAD23 proteins" *J Biol Chem*, **275**, 28433-8.
- Millau, J. F., Bastien, N. and Drouin, R. (2008a). "P53 transcriptional activities: A general overview and some thoughts" *Mutat Res*, **681**, 118-33.
- Millau, J. F., Raffin, A. L., Caillat, S., Claudet, C., Arras, G., Ugolin, N., Douki, T., Ravanat, J. L., Breton, J., Oddos, T., Dumontet, C., Sarasin, A., Chevillard, S., Favier, A. and Sauvaigo, S. (2008b). "A microarray to measure repair of damaged plasmids by cell lysates" *Lab Chip*, **8**, 1713-22.
- Mimaki, T., Nitta, M., Saijo, M., Tachi, N., Minami, R. and Tanaka, K. (1996). "Truncated XPA protein detected in atypical group A xeroderma pigmentosum" *Acta Paediatr*, **85**, 511-3.
- Minowa, O., Arai, T., Hirano, M., Monden, Y., Nakai, S., Fukuda, M., Itoh, M., Takano, H., Hippou, Y., Aburatani, H., Masumura, K., Nohmi, T., Nishimura, S. and Noda, T. (2000). "Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4156-61.
- Missura, M., Buterin, T., Hindges, R., Hubscher, U., Kasparkova, J., Brabec, V. and Naegeli, H. (2001). "Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA-RPA: an architectural function in DNA repair" *Embo J*, **20**, 3554-64.
- Mitra, S., Izumi, T., Boldogh, I., Bhakat, K. K., Hill, J. W. and Hazra, T. K. (2002). "Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes" *Free Radic Biol Med*, **33**, 15-28.
- Miura, N., Miyamoto, I., Asahina, H., Satokata, I., Tanaka, K. and Okada, Y. (1991). "Identification and characterization of xpac protein, the gene product of the human XPAC (xeroderma pigmentosum group A complementing) gene" *J Biol Chem*, **266**, 19786-9.
- Moe, A., Ringvoll, J., Nordstrand, L. M., Eide, L., Bjoras, M., Seeberg, E., Rognes, T. and Klungland, A. (2003). "Incision at hypoxanthine residues in DNA by a mammalian homologue of the Escherichia coli antimutator enzyme endonuclease V" *Nucleic Acids Res*, **31**, 3893-900.
- Moller, P. and Wallin, H. (1998). "Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product" *Mutat Res*, **410**, 271-90.
- Mori, T., Tano, K., Takimoto, K. and Utsumi, H. (1998). "Formation of 8-hydroxyguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine in DNA by riboflavin mediated photosensitization" *Biochem Biophys Res Commun*, **242**, 98-101.
- Moriwaki, S. and Kraemer, K. H. (2001). "Xeroderma pigmentosum--bridging a gap between clinic and laboratory" *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **17**, 47-54.
- Morland, I., Rolseth, V., Luna, L., Rognes, T., Bjoras, M. and Seeberg, E. (2002). "Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for

- the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA" *Nucleic Acids Res*, **30**, 4926-36.
- Mortelmans, K., Friedberg, E. C., Slor, H., Thomas, G. and Cleaver, J. E. (1976). "Defective thymine dimer excision by cell-free extracts of xeroderma pigmentosum cells" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 2757-61.
- Moser, J., Volker, M., Kool, H., Alekseev, S., Vrieling, H., Yasui, A., van Zeeland, A. A. and Mullenders, L. H. (2005). "The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions" *DNA Repair (Amst)*, **4**, 571-82.
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J. and Douki, T. (2006). "Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13765-70.
- Mouret, S., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J. and Douki, T. (2008). "Differential repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in cultured human skin cells and whole human skin" *DNA Repair (Amst)*, **7**, 704-12.
- Mu, D., Hsu, D. S. and Sancar, A. (1996). "Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease" *J Biol Chem*, **271**, 8285-94.
- Mu, D., Park, C. H., Matsunaga, T., Hsu, D. S., Reardon, J. T. and Sancar, A. (1995). "Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system" *J Biol Chem*, **270**, 2415-8.
- Mu, D. and Sancar, A. (1997a). "Model for XPC-independent transcription-coupled repair of pyrimidine dimers in humans" *J Biol Chem*, **272**, 7570-3.
- Mu, D., Wakasugi, M., Hsu, D. S. and Sancar, A. (1997b). "Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease" *J Biol Chem*, **272**, 28971-9.
- Munger, K., Basile, J. R., Duensing, S., Eichten, A., Gonzalez, S. L., Grace, M. and Zacny, V. L. (2001). "Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein" *Oncogene*, **20**, 7888-98.
- Muotri, A. R., Marchetto, M. C., Suzuki, M. F., Okazaki, K., Lotfi, C. F., Brumatti, G., Amarante-Mendes, G. P. and Menck, C. F. (2002). "Low amounts of the DNA repair XPA protein are sufficient to recover UV-resistance" *Carcinogenesis*, **23**, 1039-46.
- Nagelhus, T. A., Haug, T., Singh, K. K., Keshav, K. F., Skorpen, F., Otterlei, M., Bharati, S., Lindmo, T., Benichou, S., Benarous, R. and Krokan, H. E. (1997). "A sequence in the N-terminal region of human uracil-DNA glycosylase with homology to XPA interacts with the C-terminal part of the 34-kDa subunit of replication protein A" *J Biol Chem*, **272**, 6561-6.
- Nagelhus, T. A., Slupphaug, G., Lindmo, T. and Krokan, H. E. (1995). "Cell cycle regulation and subcellular localization of the major human uracil-DNA glycosylase" *Exp Cell Res*, **220**, 292-7.
- Nelson, J. R., Lawrence, C. W. and Hinkle, D. C. (1996). "Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta" *Science*, **272**, 1646-9.
- Ng, J. M., Vermeulen, W., van der Horst, G. T., Bergink, S., Sugawara, K., Vrieling, H. and Hoeijmakers, J. H. (2003). "A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein" *Genes Dev*, **17**, 1630-45.
- Niedernhofer, L. J. (2008). "Nucleotide excision repair deficient mouse models and neurological disease" *DNA Repair (Amst)*, **7**, 1180-9.
- Nitta, M., Saijo, M., Kodo, N., Matsuda, T., Nakatsu, Y., Tamai, H. and Tanaka, K. (2000). "A novel cytoplasmic GTPase XAB1 interacts with DNA repair protein XPA" *Nucleic Acids Res*, **28**, 4212-8.

- Nocentini, S., Coin, F., Saijo, M., Tanaka, K. and Egly, J. M. (1997). "DNA damage recognition by XPA protein promotes efficient recruitment of transcription factor II H" *J Biol Chem*, **272**, 22991-4.
- Norgauer, J., Idzko, M., Panther, E., Hellstern, O. and Herouy, Y. (2003). "Xeroderma pigmentosum" *Eur J Dermatol*, **13**, 4-9.
- Ochs, K., Sobol, R. W., Wilson, S. H. and Kaina, B. (1999). "Cells deficient in DNA polymerase beta are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage" *Cancer Res*, **59**, 1544-51.
- Oh, K. S., Imoto, K., Boyle, J., Khan, S. G. and Kraemer, K. H. (2007). "Influence of XPB helicase on recruitment and redistribution of nucleotide excision repair proteins at sites of UV-induced DNA damage" *DNA Repair (Amst)*, **6**, 1359-70.
- Oka, N. and Greenberg, M. M. (2005). "The effect of the 2-amino group of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine on translesion synthesis and duplex stability" *Nucleic Acids Res*, **33**, 1637-43.
- Osterod, M., Hollenbach, S., Hengstler, J. G., Barnes, D. E., Lindahl, T. and Epe, B. (2001). "Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice" *Carcinogenesis*, **22**, 1459-63.
- Park, C. H., Mu, D., Reardon, J. T. and Sancar, A. (1995). "The general transcription-repair factor TFIIH is recruited to the excision repair complex by the XPA protein independent of the TFIIIE transcription factor" *J Biol Chem*, **270**, 4896-902.
- Park, C. H. and Sancar, A. (1994). "Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5017-21.
- Parsons, J. L., Zharkov, D. O. and Dianov, G. L. (2005). "NEIL1 excises 3' end proximal oxidative DNA lesions resistant to cleavage by NTH1 and OGG1" *Nucleic Acids Res*, **33**, 4849-56.
- Pavey, S., Russell, T. and Gabrielli, B. (2001). "G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation" *Oncogene*, **20**, 6103-10.
- Paz-Elizur, T., Elinger, D., Leitner-Dagan, Y., Blumenstein, S., Krupsky, M., Berrebi, A., Schechtman, E. and Livneh, Z. (2007). "Development of an enzymatic DNA repair assay for molecular epidemiology studies: distribution of OGG activity in healthy individuals" *DNA Repair (Amst)*, **6**, 45-60.
- Paz-Elizur, T., Sevilya, Z., Leitner-Dagan, Y., Elinger, D., Roisman, L. C. and Livneh, Z. (2008). "DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention" *Cancer Lett*, **266**, 60-72.
- Pettijohn, D. and Hanawalt, P. (1964). "Evidence For Repair-Replication Of Ultraviolet Damaged Dna In Bacteria" *J Mol Biol*, **9**, 395-410.
- Pfeifer, G. P., You, Y. H. and Besaratinia, A. (2005). "Mutations induced by ultraviolet light" *Mutat Res*, **571**, 19-31.
- Pitsikas, P., Francis, M. A. and Rainbow, A. J. (2005). "Enhanced host cell reactivation of a UV-damaged reporter gene in pre-UV-treated cells is delayed in Cockayne syndrome cells" *J Photochem Photobiol B*, **81**, 89-97.
- Prasad, R., Lavrik, O. I., Kim, S. J., Kedar, P., Yang, X. P., Vande Berg, B. J. and Wilson, S. H. (2001). "DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis" *J Biol Chem*, **276**, 32411-4.
- Qiao, Y., Spitz, M. R., Guo, Z., Hadeyati, M., Grossman, L., Kraemer, K. H. and Wei, Q. (2002). "Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with

- polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes" *Mutat Res*, **509**, 165-74.
- Rademakers, S., Volker, M., Hoogstraten, D., Nigg, A. L., Mone, M. J., Van Zeeland, A. A., Hoeijmakers, J. H., Houtsmuller, A. B. and Vermeulen, W. (2003). "Xeroderma pigmentosum group A protein loads as a separate factor onto DNA lesions" *Mol Cell Biol*, **23**, 5755-67.
- Rapic-Otrin, V., Navazza, V., Nardo, T., Botta, E., McLenigan, M., Bisi, D. C., Levine, A. S. and Stefanini, M. (2003). "True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product" *Hum Mol Genet*, **12**, 1507-22.
- Rasmussen, R. E. and Painter, R. B. (1964). "Evidence For Repair Of Ultra-Violet Damaged Deoxyribonucleic Acid In Cultured Mammalian Cells" *Nature*, **203**, 1360-2.
- Reardon, J. T., Bessho, T., Kung, H. C., Bolton, P. H. and Sancar, A. (1997). "In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9463-8.
- Reardon, J. T. and Sancar, A. (2004). "Thermodynamic cooperativity and kinetic proofreading in DNA damage recognition and repair" *Cell Cycle*, **3**, 141-4.
- Rechkunova, N. I., Mal'tseva, E. A. and Lavrik, O. I. (2008). "[Nucleotide excision repair in mammalia: mechanism of a primary damage recognition]" *Mol Biol (Mosk)*, **42**, 24-31.
- Riedl, T., Hanaoka, F. and Egly, J. M. (2003). "The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA" *Embo J*, **22**, 5293-303.
- Robins, P., Jones, C. J., Biggerstaff, M., Lindahl, T. and Wood, R. D. (1991). "Complementation of DNA repair in xeroderma pigmentosum group A cell extracts by a protein with affinity for damaged DNA" *Embo J*, **10**, 3913-21.
- Rolig, R. L. and McKinnon, P. J. (2000). "Linking DNA damage and neurodegeneration" *Trends Neurosci*, **23**, 417-24.
- Roos, W. P. and Kaina, B. (2006). "DNA damage-induced cell death by apoptosis" *Trends Mol Med*, **12**, 440-50.
- Rouse, J. and Jackson, S. P. (2002). "Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage" *Science*, **297**, 547-51.
- Runger, T. M., Epe, B. and Moller, K. (1995). "Repair of ultraviolet B and singlet oxygen-induced DNA damage in xeroderma pigmentosum cells" *J Invest Dermatol*, **104**, 68-73.
- Sakumi, K., Tominaga, Y., Furuichi, M., Xu, P., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M. and Nakabeppu, Y. (2003). "Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption" *Cancer Res*, **63**, 902-5.
- Samejima, K. and Earnshaw, W. C. (2005). "Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis" *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 677-88.
- Sarasin, A. (1999). "The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis" *Mutat Res*, **428**, 5-10.
- Sato, M., Nishigori, C., Yagi, T. and Takebe, H. (1996). "Aberrant splicing and truncated-protein expression due to a newly identified XPA gene mutation" *Mutat Res*, **362**, 199-208.
- Satokata, I., Tanaka, K., Miura, N., Narita, M., Mimaki, T., Satoh, Y., Kondo, S. and Okada, Y. (1992). "Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum" *Mutat Res*, **273**, 193-202.
- Sattler, U., Frit, P., Salles, B. and Calsou, P. (2003). "Long-patch DNA repair synthesis during base excision repair in mammalian cells" *EMBO Rep*, **4**, 363-7.

- Sauvaigo, S., Guerniou, V., Rapin, D., Gasparutto, D., Caillat, S. and Favier, A. (2004). "An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage" *Anal Biochem*, **333**, 182-92.
- Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., Chambon, P. and Egly, J. M. (1993). "DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor" *Science*, **260**, 58-63.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T. and Gey, G. O. (1953). "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix" *J Exp Med*, **97**, 695-710.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C. and de Murcia, G. (2006). "Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule" *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 517-28.
- Selby, C. P. and Sancar, A. (1997a). "Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II" *J Biol Chem*, **272**, 1885-90.
- Selby, C. P. and Sancar, A. (1997b). "Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11205-9.
- Seo, Y. R., Fishel, M. L., Amundson, S., Kelley, M. R. and Smith, M. L. (2002). "Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence" *Oncogene*, **21**, 731-7.
- Seo, Y. R. and Jung, H. J. (2004). "The potential roles of p53 tumor suppressor in nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER)" *Exp Mol Med*, **36**, 505-9.
- Setlow, R. B. and Carrier, W. L. (1964). "The Disappearance Of Thymine Dimers From Dna: An Error-Correcting Mechanism" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **51**, 226-31.
- Shimizu, Y., Iwai, S., Hanaoka, F. and Sugawara, K. (2003). "Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase" *Embo J*, **22**, 164-73.
- Sibghatullah, Husain, I., Carlton, W. and Sancar, A. (1989). "Human nucleotide excision repair in vitro: repair of pyrimidine dimers, psoralen and cisplatin adducts by HeLa cell-free extract" *Nucleic Acids Res*, **17**, 4471-84.
- Sidwell, R. U., Sandison, A., Wing, J., Fawcett, H. D., Seet, J. E., Fisher, C., Nardo, T., Stefanini, M., Lehmann, A. R. and Cream, J. J. (2006). "A novel mutation in the XPA gene associated with unusually mild clinical features in a patient who developed a spindle cell melanoma" *Br J Dermatol*, **155**, 81-8.
- Slebos, R. J. and Taylor, J. A. (2001). "A novel host cell reactivation assay to assess homologous recombination capacity in human cancer cell lines" *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 212-9.
- Solimando, L., Luijsterburg, M. S., Vecchio, L., Vermeulen, W., van Driel, R. and Fakan, S. (2009). "Spatial organization of nucleotide excision repair proteins after UV-induced DNA damage in the human cell nucleus" *J Cell Sci*, **122**, 83-91.
- Sousa, M. M., Krokan, H. E. and Slupphaug, G. (2007). "DNA-uracil and human pathology" *Mol Aspects Med*, **28**, 276-306.
- Spivak, G. and Hanawalt, P. C. (2006). "Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts" *DNA Repair (Amst)*, **5**, 13-22.
- Stanislawska, J. and Olszewski, W. L. (2005). "RNA interference--significance and applications" *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **53**, 39-46.
- Starcevic, D., Dalal, S. and Sweasy, J. B. (2004). "Is there a link between DNA polymerase beta and cancer?" *Cell Cycle*, **3**, 998-1001.

- Stary, A. and Sarasin, A. (2002). "The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome" *Biochimie*, **84**, 49-60.
- Steitz, T. A. (1999). "DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms" *J Biol Chem*, **274**, 17395-8.
- Stevnsner, T., Muftuoglu, M., Aamann, M. D. and Bohr, V. A. (2008). "The role of Cockayne Syndrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging" *Mech Ageing Dev*, **129**, 441-8.
- Subba Rao, K. (2007). "Mechanisms of disease: DNA repair defects and neurological disease" *Nat Clin Pract Neurol*, **3**, 162-72.
- Sugasawa, K. (2008). "Xeroderma pigmentosum genes: functions inside and outside DNA repair" *Carcinogenesis*, **29**, 455-65.
- Sugasawa, K., Masutani, C. and Hanaoka, F. (1993). "Cell-free repair of UV-damaged simian virus 40 chromosomes in human cell extracts. I. Development of a cell-free system detecting excision repair of UV-irradiated SV40 chromosomes" *J Biol Chem*, **268**, 9098-104.
- Sugasawa, K., Masutani, C., Uchida, A., Maekawa, T., van der Spek, P. J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. and Hanaoka, F. (1996). "HHR23B, a human Rad23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair in vitro" *Mol Cell Biol*, **16**, 4852-61.
- Sugasawa, K., Ng, J. M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P. J., Eker, A. P., Hanaoka, F., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J. H. (1998). "Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair" *Mol Cell*, **2**, 223-32.
- Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S. and Hanaoka, F. (2001). "A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair" *Genes Dev*, **15**, 507-21.
- Sutherland, B. M., Bennett, P. V., Sutherland, J. C. and Laval, J. (2002). "Clustered DNA damages induced by x rays in human cells" *Radiat Res*, **157**, 611-6.
- Svejstrup, J. Q. (2002). "Mechanisms of transcription-coupled DNA repair" *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 21-9.
- Svejstrup, J. Q., Wang, Z., Feaver, W. J., Wu, X., Bushnell, D. A., Donahue, T. F., Friedberg, E. C. and Kornberg, R. D. (1995). "Different forms of TFIIH for transcription and DNA repair: holo-TFIIH and a nucleotide excision repairosome" *Cell*, **80**, 21-8.
- Svetlova, M., Nikiforov, A., Solovjeva, L., Pleskach, N., Tomilin, N. and Hanawalt, P. C. (1999). "Reduced extractability of the XPA DNA repair protein in ultraviolet light-irradiated mammalian cells" *FEBS Lett*, **463**, 49-52.
- Svoboda, D. L., Briley, L. P. and Vos, J. M. (1998). "Defective bypass replication of a leading strand cyclobutane thymine dimer in xeroderma pigmentosum variant cell extracts" *Cancer Res*, **58**, 2445-8.
- Szymkowski, D. E., Lawrence, C. W. and Wood, R. D. (1993). "Repair by human cell extracts of single (6-4) and cyclobutane thymine-thymine photoproducts in DNA" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9823-7.
- Tang, J. and Chu, G. (2002). "Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein" *DNA Repair (Amst)*, **1**, 601-16.
- Tapias, A., Auriol, J., Forget, D., Enzlin, J. H., Scharer, O. D., Coin, F., Coulombe, B. and Egly, J. M. (2004). "Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors" *J Biol Chem*, **279**, 19074-83.
- Taylor, E. M., Broughton, B. C., Botta, E., Stefanini, M., Sarasin, A., Jaspers, N. G., Fawcett, H., Harcourt, S. A., Arlett, C. F. and Lehmann, A. R. (1997). "Xeroderma pigmentosum

- and trichothiodystrophy are associated with different mutations in the XPD (ERCC2) repair/transcription gene" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8658-63.
- Taylor, J. S. and O'Day, C. L. (1990). "cis-syn thymine dimers are not absolute blocks to replication by DNA polymerase I of *Escherichia coli* in vitro" *Biochemistry*, **29**, 1624-32.
- Thorslund, T., von Kobbe, C., Harrigan, J. A., Indig, F. E., Christiansen, M., Stevnsner, T. and Bohr, V. A. (2005). "Cooperation of the Cockayne syndrome group B protein and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in the response to oxidative stress" *Mol Cell Biol*, **25**, 7625-36.
- Tornaletti, S., Maeda, L. S. and Hanawalt, P. C. (2006). "Transcription arrest at an abasic site in the transcribed strand of template DNA" *Chem Res Toxicol*, **19**, 1215-20.
- Tornaletti, S., Maeda, L. S., Lloyd, D. R., Reines, D. and Hanawalt, P. C. (2001). "Effect of thymine glycol on transcription elongation by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II" *J Biol Chem*, **276**, 45367-71.
- Trincao, J., Johnson, R. E., Escalante, C. R., Prakash, S., Prakash, L. and Aggarwal, A. K. (2001). "Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase ϵ : implications for translesion DNA synthesis" *Mol Cell*, **8**, 417-26.
- Tripsianes, K., Folkers, G. E., Zheng, C., Das, D., Grinstead, J. S., Kaptein, R. and Boelens, R. (2007). "Analysis of the XPA and ssDNA-binding surfaces on the central domain of human ERCC1 reveals evidence for subfunctionalization" *Nucleic Acids Res*, **35**, 5789-98.
- Tsodikov, O. V., Ivanov, D., Orelli, B., Staresincic, L., Shoshani, I., Oberman, R., Scharer, O. D., Wagner, G. and Ellenberger, T. (2007). "Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA" *Embo J*, **26**, 4768-76.
- Tuo, J., Jaruga, P., Rodriguez, H., Bohr, V. A. and Dizdaroglu, M. (2003). "Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine resulting from oxidative stress" *Faseb J*, **17**, 668-74.
- van Hoffen, A., Balajee, A. S., van Zeeland, A. A. and Mullenders, L. H. (2003). "Nucleotide excision repair and its interplay with transcription" *Toxicology*, **193**, 79-90.
- van Hoffen, A., Venema, J., Meschini, R., van Zeeland, A. A. and Mullenders, L. H. (1995). "Transcription-coupled repair removes both cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts with equal efficiency and in a sequential way from transcribed DNA in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts" *Embo J*, **14**, 360-7.
- van Oosterwijk, M. F., Filon, R., Kalle, W. H., Mullenders, L. H. and van Zeeland, A. A. (1996). "The sensitivity of human fibroblasts to N-acetoxy-2-acetylaminofluorene is determined by the extent of transcription-coupled repair, and/or their capability to counteract RNA synthesis inhibition" *Nucleic Acids Res*, **24**, 4653-9.
- Vartanian, V., Lowell, B., Minko, I. G., Wood, T. G., Ceci, J. D., George, S., Ballinger, S. W., Corless, C. L., McCullough, A. K. and Lloyd, R. S. (2006). "The metabolic syndrome resulting from a knockout of the NEIL1 DNA glycosylase" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1864-9.
- Vasquez, K. M., Christensen, J., Li, L., Finch, R. A. and Glazer, P. M. (2002). "Human XPA and RPA DNA repair proteins participate in specific recognition of triplex-induced helical distortions" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5848-53.
- Venema, J., Mullenders, L. H., Natarajan, A. T., van Zeeland, A. A. and Mayne, L. V. (1990a). "The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4707-11.

- Venema, J., van Hoffen, A., Natarajan, A. T., van Zeeland, A. A. and Mullenders, L. H. (1990b). "The residual repair capacity of xeroderma pigmentosum complementation group C fibroblasts is highly specific for transcriptionally active DNA" *Nucleic Acids Res*, **18**, 443-8.
- Verly, W. G. and Paquette, Y. (1972). "An endonuclease for depurinated DNA in Escherichia coli B" *Can J Biochem*, **50**, 217-24.
- Volker, M., Mone, M. J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., van Driel, R., van Zeeland, A. A. and Mullenders, L. H. (2001). "Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo" *Mol Cell*, **8**, 213-24.
- von Mikecz, A. (2006). "The nuclear ubiquitin-proteasome system" *J Cell Sci*, **119**, 1977-84.
- Vousden, K. H. and Lu, X. (2002). "Live or let die: the cell's response to p53" *Nat Rev Cancer*, **2**, 594-604.
- Wada, A., Fukuda, M., Mishima, M. and Nishida, E. (1998). "Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein" *Embo J*, **17**, 1635-41.
- Wakasugi, M. and Sancar, A. (1998). "Assembly, subunit composition, and footprint of human DNA repair excision nuclease" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6669-74.
- Wakasugi, M. and Sancar, A. (1999). "Order of assembly of human DNA repair excision nuclease" *J Biol Chem*, **274**, 18759-68.
- Wang, Q. E., Zhu, Q., Wani, M. A., Wani, G., Chen, J. and Wani, A. A. (2003). "Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage" *DNA Repair (Amst)*, **2**, 483-99.
- Wang, X. W., Vermeulen, W., Coursen, J. D., Gibson, M., Lupold, S. E., Forrester, K., Xu, G., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J. H. and Harris, C. C. (1996). "The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway" *Genes Dev*, **10**, 1219-32.
- Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Freidberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G. and et al. (1995). "p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity" *Nat Genet*, **10**, 188-95.
- Washington, M. T., Johnson, R. E., Prakash, S. and Prakash, L. (1999). "Fidelity and processivity of Saccharomyces cerevisiae DNA polymerase eta" *J Biol Chem*, **274**, 36835-8.
- Watanabe, K., Liberman, R. G., Skipper, P. L., Tannenbaum, S. R. and Guengerich, F. P. (2007). "Analysis of DNA adducts formed in vivo in rats and mice from 1,2-dibromoethane, 1,2-dichloroethane, dibromomethane, and dichloromethane using HPLC/accelerator mass spectrometry and relevance to risk estimates" *Chem Res Toxicol*, **20**, 1594-600.
- Waters, T. R., Gallinari, P., Jiricny, J. and Swann, P. F. (1999). "Human thymine DNA glycosylase binds to apurinic sites in DNA but is displaced by human apurinic endonuclease 1" *J Biol Chem*, **274**, 67-74.
- Waters, T. R. and Swann, P. F. (1998). "Kinetics of the action of thymine DNA glycosylase" *J Biol Chem*, **273**, 20007-14.
- Watson, J. D. and Crick, F. H. (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid" *Nature*, **171**, 737-8.
- Wiederhold, L., Leppard, J. B., Kedar, P., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Weinfeld, M., Tomkinson, A. E., Izumi, T., Prasad, R., Wilson, S. H., Mitra, S. and Hazra, T. K. (2004). "AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells" *Mol Cell*, **15**, 209-20.

- Wilson, D. M., 3rd and Bohr, V. A. (2007). "The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease" *DNA Repair (Amst)*, **6**, 544-59.
- Wittschieben, B. O., Iwai, S. and Wood, R. D. (2005). "DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA" *J Biol Chem*, **280**, 39982-9.
- Wood, R. D. (1999). "DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells" *Biochimie*, **81**, 39-44.
- Wood, R. D., Robins, P. and Lindahl, T. (1988). "Complementation of the xeroderma pigmentosum DNA repair defect in cell-free extracts" *Cell*, **53**, 97-106.
- Wu, X., Shell, S. M., Liu, Y. and Zou, Y. (2007). "ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation" *Oncogene*, **26**, 757-64.
- Wu, X., Shell, S. M., Yang, Z. and Zou, Y. (2006). "Phosphorylation of nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A by ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related-dependent checkpoint pathway promotes cell survival in response to UV irradiation" *Cancer Res*, **66**, 2997-3005.
- Yang, W. (2006). "Poor base stacking at DNA lesions may initiate recognition by many repair proteins" *DNA Repair (Amst)*, **5**, 654-66.
- Yang, Z. G., Liu, Y., Mao, L. Y., Zhang, J. T. and Zou, Y. (2002). "Dimerization of human XPA and formation of XPA2-RPA protein complex" *Biochemistry*, **41**, 13012-20.
- Yokoi, M., Masutani, C., Maekawa, T., Sugasawa, K., Ohkuma, Y. and Hanaoka, F. (2000). "The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA" *J Biol Chem*, **275**, 9870-5.
- You, J. S., Wang, M. and Lee, S. H. (2003). "Biochemical analysis of the damage recognition process in nucleotide excision repair" *J Biol Chem*, **278**, 7476-85.
- Zelle, B. and Lohman, P. H. (1979). "Repair of UV-endonuclease-susceptible sites in the 7 complementation groups of xeroderma pigmentosum A through G" *Mutat Res*, **62**, 363-8.
- Zhang, X., Rosenstein, B. S., Wang, Y., Lebwohl, M., Mitchell, D. M. and Wei, H. (1997). "Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells" *Photochem Photobiol*, **65**, 119-24.
- Zhen, W., Evans, M. K., Haggerty, C. M. and Bohr, V. A. (1993). "Deficient gene specific repair of cisplatin-induced lesions in Xeroderma pigmentosum and Fanconi's anemia cell lines" *Carcinogenesis*, **14**, 919-24.
- Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S. H. and Prives, C. (2001). "A role for p53 in base excision repair" *Embo J*, **20**, 914-23.
- Zou, L. and Elledge, S. J. (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes" *Science*, **300**, 1542-8.

Annexes

Annexe 1

Article scientifique en co-premier auteur, publié dans Lab on a chip :

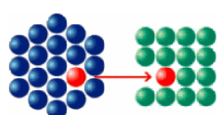
Millau, J. F., Raffin, A. L., Caillat, S., Claudet, C., Arras, G., Ugolin, N., Douki, T., Ravanat, J. L., Breton, J., Oddos, T., Dumontet, C., Sarasin, A., Chevillard, S., Favier, A. and Sauvaigo, S. (2008b). "A microarray to measure repair of damaged plasmids by cell lysates" *Lab Chip*, **8**, 1713-22.

Annexe 2

En 2008, j'ai choisi de participer à l'écriture du « Nouveau Chapitre de la Thèse », en partenariat avec l'association Bernard Grégory.

Cet exercice allie la vulgarisation scientifique, la définition de la stratégie de mon projet et de son déroulement ainsi que des données financières relatives au projet de recherche.

L'expérience du Nouveau Chapitre de la Thèse a été très enrichissante et a permis de valoriser mon travail.



Association Bernard Gregory
www.abg.asso.fr



Valorisation des compétences des docteurs

«un nouveau chapitre de la thèse ®»

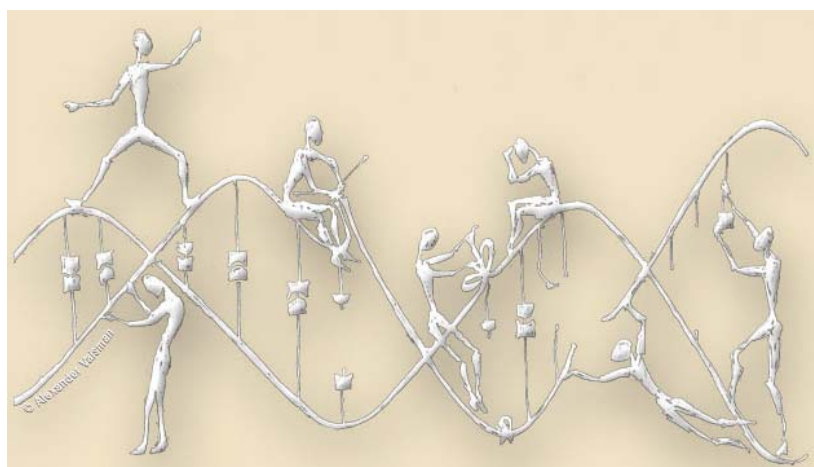
Anne-Laure RAFFIN

Ecole doctorale Chimie et Sciences du Vivant, spécialité Biotechnologie

Université Joseph Fourier, Grenoble I

Coordonné par Jean-Christophe KLEIN

Réparation de l'ADN chez l'Homme



Présentation orale du « NCT » : Novembre 2008

Sujet académique de la thèse : Phénotypage de la réparation de l'ADN de lignées Xeroderma pigmentosum par un test *in vitro* multiparamétrique

Directrice de Thèse : Dr. Sylvie SAUVAIGO

1. Cadre général et enjeux de ma thèse

1.1. Présentation succincte

Lorsqu'un plombier vient réparer une fuite d'eau sous l'évier de votre cuisine, il ouvre sa boîte à outils et utilise tout un arsenal d'instruments : marteau, coupe-tube, clef anglaise... Si un outil manque, la fuite ne sera pas correctement réparée et elle risque de réapparaître rapidement. Le corps humain peut être comparé à une boîte à outils. Les différents instruments seraient les protéines nécessaires à la réparation de l'ADN, molécule support de l'information génétique et dont l'intégrité doit être maintenue pour éviter notamment les phénomènes de cancérogénèse.

Lorsqu'un vacancier se fait bronzer sur la plage l'été en plein soleil, les rayonnements UV vont altérer la molécule d'ADN. Le corps humain dispose d'une machinerie complexe pour réparer les dommages occasionnés. Il existe des maladies de la réparation de l'ADN, entre autres celle des « enfants de la lune » (Xeroderma pigmentosum). Ces enfants disposent malheureusement d'une boîte à outils incomplète ; ils sont donc déficients pour la réparation de l'ADN. Les rayonnements UV engendrent des altérations dans l'ADN qui ne pourront pas être réparées (ou très mal) ; ces enfants vivent enfermés, loin des rayons du soleil. Par conséquent, les cellules de ces patients constituent un système modèle pour étudier la réparation de l'ADN. Il existe 8 groupes au sein de cette maladie, chaque groupe faisant référence à une anomalie génétique. La figure ci-dessous récapitule la relation de cause à effet entre le soleil et la réparation de l'ADN.

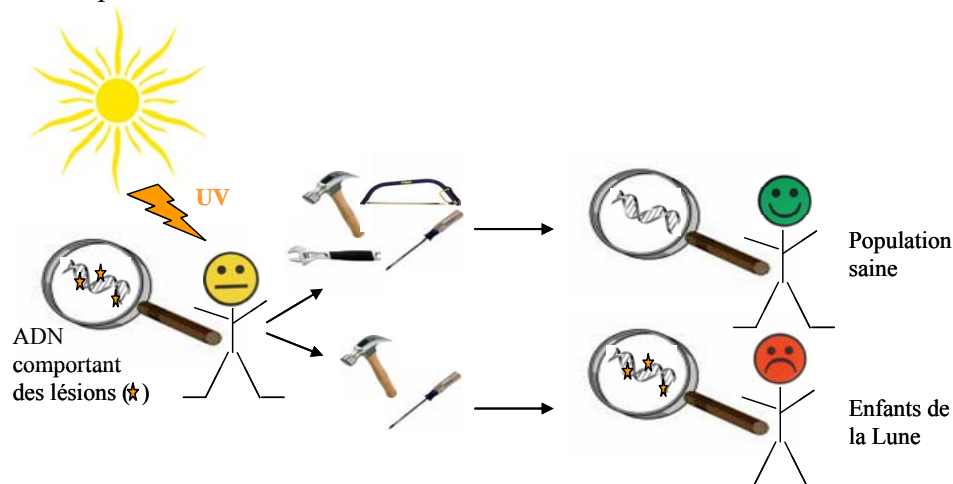


Figure 1 : la réparation des dommages de l'ADN suite à une exposition au soleil

Mon sujet de thèse consiste à étudier la réparation de l'ADN de ces cellules modèles à l'aide d'un test miniaturisé développé au sein de mon laboratoire. Cette technique innovante permet d'obtenir des résultats précis en terme de niveau de réparation de l'ADN. De plus, la complexité de la réparation est ici appréhendée avec une vision plus globale et donc moins restrictive par rapport à ce qui est décrit dans la littérature. Le but est d'établir « une cartographie » de la réparation de l'ADN pour les différents groupes de la maladie XP. La finalité de mon projet se situe au niveau du diagnostic de ces enfants. Actuellement, le diagnostic de cette maladie est très long et laborieux. Notre test miniaturisé pourrait être utilisé en complément de la méthode de diagnostic de référence.

Mon projet permet de faire un petit pas vers la compréhension au niveau fondamental des maladies de la réparation de l'ADN (mécanismes mis en cause, diagnostic). De façon plus générale, mon étude permet de faire la lumière sur la complexité des voies de réparation de

l'ADN, mécanisme indispensable à la vie sur Terre. Les enjeux se situent donc essentiellement au niveau de la santé publique. Les maladies de la réparation sont dites « orphelines » car elles concernent très peu de personnes (environ 3000 cas dans le monde). Ainsi, la recherche sur ces maladies ne présente pas un fort impact économique.

La réparation de l'ADN est une thématique en plein essor comme en témoigne le nombre important de publications scientifiques, mais aussi les nombreux produits dont le marketing repose sur les effets bénéfiques sur la santé d'une stimulation de la réparation de l'ADN. En effet, depuis quelques années, des crèmes anti-âge apparaissent dans les rayons des magasins avec la mention « réparation de l'ADN ». De plus, le monde occidental est particulièrement sensibilisé aux bienfaits des aliments riches en antioxydants (comme le thé, la carotte, l'huile d'olive). Les antioxydants sont connus pour jouer un rôle protecteur au niveau de la cellule et particulièrement au niveau de l'ADN.

1.2. Le contexte de ma thèse

1.2.1. *Mon projet et le LAN*

Mon projet de thèse fait partie intégrante des thématiques développées au laboratoire « Lésions des Acides Nucléiques » (LAN). Le LAN compte 14 personnes employées de façon permanente et environ 20 personnes en mission temporaire chaque année. Plusieurs axes de recherche sont développés au LAN dont le point commun reste l'ADN, ses dommages et sa réparation. Le LAN peut être scindé en 3 sous-équipes thématiques différentes mais cette séparation n'a aucune valeur administrative et de très nombreuses interactions existent entre les différentes sous-équipes. Où me situer dans l'organigramme (figure 2) ?

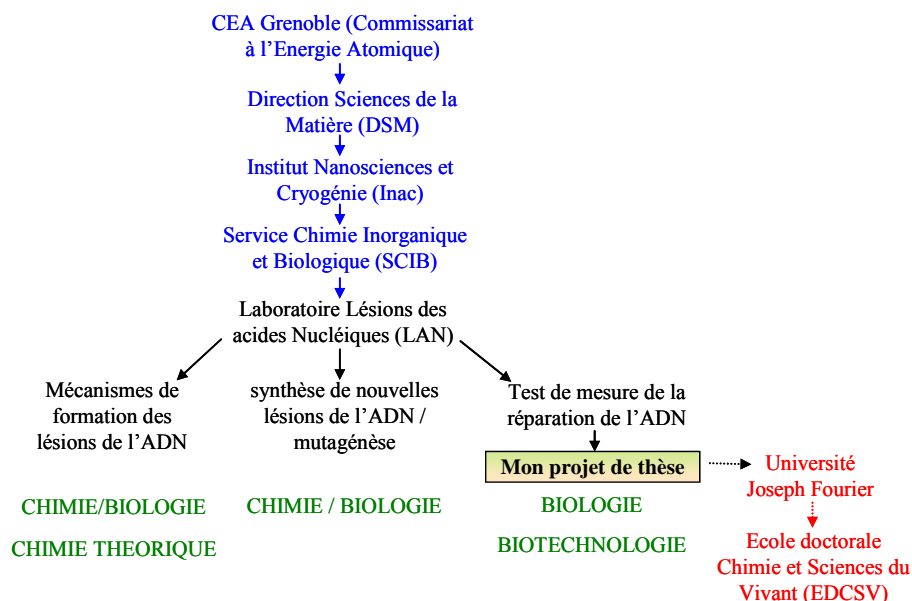


Figure 2 : organisation de la recherche au LAN

1.2.2. *Le LAN et mon projet dans le contexte scientifique international*

Le LAN a été créé en 1983 par le Docteur Jean Cadet. Les recherches du LAN ont une reconnaissance internationale ; ses points forts sont la synthèse d'ADN lésé, les techniques d'analyse des lésions de l'ADN et les études théoriques sur la mécanistique de formation des lésions de l'ADN. Mon projet s'inscrit dans une activité émergente du LAN, néanmoins

reconnue dans le monde des biotechnologies et de la santé pour les nombreuses applications que peut offrir le test développé pour mesurer la réparation de l'ADN.

Un brevet, protégeant le test utilisé pour mon projet, a été déposé le 20 Juin 2005. Ce brevet est en vigueur en France (FR 2887261) et a une extension en Europe (EP 1899485) et dans le monde (WO 2006/136686). Si la réparation de l'ADN est très étudiée en ce moment (en France et dans le Monde) grâce à des méthodes classiques de la biologie moléculaire et de la biochimie, nous sommes les seuls à l'étudier avec cet outil innovant et performant qui permet d'aborder la thématique sous un angle nouveau.

1.2.3. Réseaux et partenariats du LAN

Le LAN développe de nombreux partenariats aussi bien avec des **institutions publiques** (collaboration avec l'université Joseph Fourier de Grenoble, le Centre Léon Bérard de Lyon, l'Institut Gustave Roussy à Villejuif, le Muséum national d'Histoire naturelle, l'Institut Curie, le centre d'étude spatiale en Allemagne, le service de radiothérapie de Sherbrooke au Canada, le NIH à Bethesda aux Etats-Unis), qu'avec des **industriels** (Johnson & Johnson, Oncodesign, LVMH, Astra Zeneca, Pierre Fabre et le Consortium Européen des Fédérations de l'Industrie Chimique).

1.2.4. Moyens mis à disposition pour mon projet

Mon projet de thèse s'inscrivait dans la continuité d'une autre thèse initiée deux ans auparavant. Mon projet s'est articulé autour de la validation biologique du test développé par Jean-François Millau, à partir d'échantillons de patients déficients pour la réparation de l'ADN. Si les bases techniques de mon projet étaient disponibles, la problématique plus fondamentale sur les maladies de la réparation avait été très peu abordée avant le début de mon projet.

Mon projet de thèse a été encadré par ma directrice, Dr. Sylvie Sauvaigo, chercheur au CEA. J'ai pu bénéficier de l'aide de deux techniciens. J'ai eu la chance également d'encadrer trois stagiaires ; leur contribution technique aux expériences a constitué une aide précieuse. J'ai pu profiter de l'ensemble de l'environnement technique du LAN (laboratoires et instruments). J'ai partagé un bureau avec deux autres personnes et j'ai pu avoir accès à un ordinateur personnel (2 ans/3). Une secrétaire pour l'ensemble du SCIB a permis de régler les formalités administratives. L'environnement technique, financier et humain a constitué un facteur de succès pour ma thèse.

1.3. Les raisons de ce choix

Les raisons qui m'ont poussée à débiter le projet sont multiples. Tout d'abord, le fil conducteur de mes études a toujours été la biologie, mon grand intérêt pour cette discipline remontant au lycée. Après un cursus universitaire en biologie microbienne suivi par un cycle ingénieur en agronomie générale à l'AgroParistech (ex-INAPG), une de mes priorités était de me rapprocher d'une thématique de biologie humaine et médicale. J'ai donc choisi mon sujet de thèse en tenant compte de ce souhait. Le sujet était bien défini au préalable par ma directrice de thèse mais lors de mon entretien et au début de ma thèse, je pense que mes aspirations de biologiste ont orienté le sujet vers l'utilisation de matériel biologique humain.

La rencontre avec mon projet s'est faite un peu au hasard en cherchant des sujets de thèse sur Internet. Mon œil a été très vite attiré par celui-ci. J'ai été conquise par le sujet et son environnement. La motivation première pour débiter ce projet a vraiment été le sujet en lui-même, bien au-delà du diplôme de Docteur ès-sciences vers lequel il conduisait. Ce projet constituait avant tout pour moi une opportunité d'acquérir une expérience professionnelle enrichissante.

Le caractère innovant de la technologie employée m'a également beaucoup séduite et a pesé dans la balance au moment d'accepter le projet. De plus, les partenariats industriels développés par ma directrice de thèse ainsi que son projet personnel de création de start-up m'ont convaincue de l'environnement favorable du projet. D'autre part, mon projet professionnel étant plutôt orienté vers le secteur privé, cet argument donnait un côté appliqué et donc cohérent à mon projet.

2. Déroulement, gestion et coût du projet

2.1. Préparation et cadrage du projet

2.1.1. Evaluation des facteurs de risques et de succès

Avant mon arrivée, la réparation de l'ADN était essentiellement étudiée au LAN à partir de matériel biochimique simple (enzymes purifiées, extrait cellulaire commercial). En effet, lors de la mise au point du test, il était essentiel d'utiliser un système simplifié. A mon arrivée, le défi du projet consistait à complexifier le système en utilisant du matériel biologique humain (cellules de patients XP). Ainsi, la transition vers une approche plus fondamentale de la réparation de l'ADN n'était pas simple à mettre en place et n'était pas sans risque. En effet, l'utilisation de cellules humaines n'est pas sans inconvénients : temps pris par la culture et reproductibilité des expériences parfois mauvaise dû au facteur « cellule » (la vie n'est pas parfaite !). De plus, le caractère très novateur du sujet, dû à l'utilisation d'un outil technologique innovant apportait une grande part d'inconnu. Cependant, la bibliographie sur le sujet est très fournie, ce qui a permis de confronter nos résultats aux données de la littérature.

Etant donné le caractère innovant de la technologie employée, la méthode était encore en cours de développement à mon arrivée. Ceci a constitué un facteur de risque tout au long de ma thèse et il a fallu jongler avec les aléas rencontrés. De plus, le test utilise un support commercialisé par un unique fournisseur (Perkin Elmer). Ce support est indispensable à mon projet : l'arrêt de fourniture de ces supports constituait un risque dès le début du projet.

Enfin, l'environnement économique de mon projet a été très favorable, aucune expérience n'a été écartée faute de moyens.

2.1.2. Collaborations

J'ai choisi de collaborer avec deux laboratoires pour la fourniture du matériel biologique. Tout d'abord le laboratoire «génétique de la radiosensibilité» du CEA de Fontenay-aux-Roses pour le premier modèle cellulaire utilisé en début de thèse, et ensuite le laboratoire «Stabilité génétique et oncogénèse» de l'Institut Gustave Roussy à Villejuif pour les cellules issues de patients « les enfants de la lune ».

2.1.3. Gestion des aspects contractuels

Le CEA est propriétaire des inventions et le stipule dans le contrat de travail. Une autorisation de publication est remplie et visée par la hiérarchie avant chaque départ en congrès où j'ai présenté un poster ou réalisé une conférence orale.

La sécurité sur le lieu de travail est une préoccupation importante du CEA. Ainsi, de nombreuses règles sont à respecter en matière d'hygiène (particulièrement en culture cellulaire) et de sécurité (port des équipements de protection individuelle, formation risque incendie, formation sécurité sur le centre du CEA pour chaque nouvel arrivant).

2.2. Conduite du projet

Mon projet de thèse s'est déroulé de façon linéaire, pas à pas suivant une démarche exploratoire. Du fait de mon sujet et des aléas qui ont façonné le projet, celui-ci s'est déroulé suivant le schéma ci-dessous (figure 3).

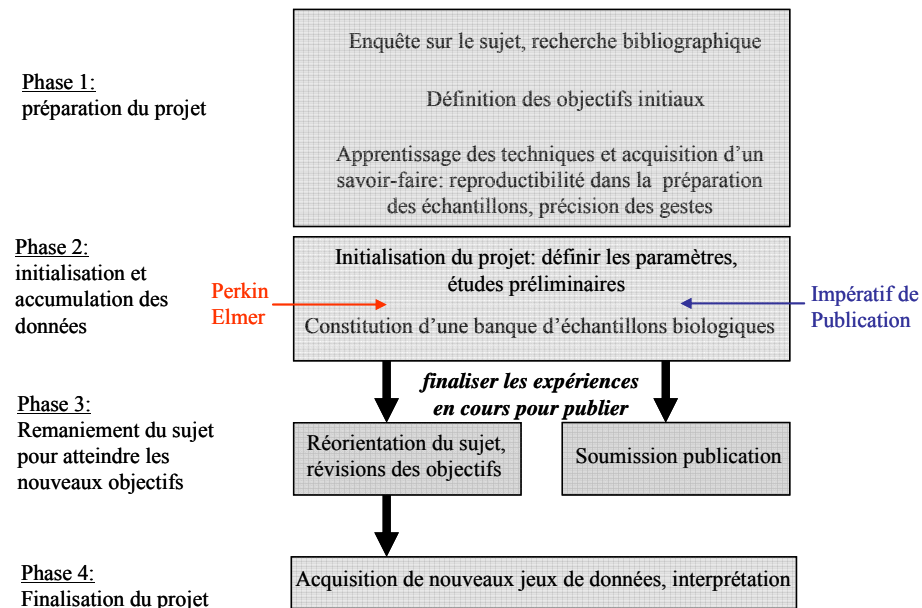


Figure 3 : Déroulement de mon projet de thèse

Au début du projet (phase 1), il apparaissait essentiel que je me familiarise avec la thématique qui était totalement nouvelle pour moi. Ainsi, je me suis informée sur l'état de l'art, et j'ai rédigé une synthèse bibliographique. Cette synthèse a d'ailleurs servi par la suite aux stagiaires que j'ai encadrés. Cette enquête sur le sujet a permis de définir des objectifs initiaux. Il a fallu ensuite que je me familiarise avec la technique, puisque mon projet repose essentiellement sur des expériences biologiques. J'ai donc appris la culture de cellules humaines, mais aussi toutes les techniques qui allaient me servir tout au long de ma thèse. Je suis allée faire deux séjours d'une semaine dans les laboratoires collaborateurs pour m'imprégner de leur savoir-faire et pour reproduire correctement les gestes.

Une fois, les bases scientifiques et techniques posées, j'ai pu initialiser le projet en débutant les premières expériences (phase 2). La première étape du projet consistait à définir les paramètres de l'étude. J'ai donc réalisé plusieurs expériences en allant à tâtons pour dégager les paramètres optimaux (doses d'UVB, nombre de cellules pour préparer les échantillons, concentration en extrait protéique utilisée). J'ai réalisé des expériences préliminaires sur un premier modèle cellulaire (laboratoire collaborateur) qui ont permis de dégrossir le sujet et d'émettre des hypothèses. S'en est suivie une phase d'amplification des échantillons biologiques (phase 2). Je suis passée sur un deuxième modèle cellulaire et j'ai étendu l'étude à toute la panoplie des patients XP.

Au moment où mon sujet était dans sa phase exponentielle, deux éléments sont venus perturber mon projet. Tout d'abord, la rupture de fourniture du support (indispensable à mon projet) par Perkin Elmer a entraîné rapidement une pénurie. Face à ce problème technique, il est apparu essentiel de sélectionner les expériences à faire suivant un ordre d'importance (phase 3). Ainsi, j'ai dû rigoureusement planifier mes expériences et gérer au mieux mon stock de lames imparfaites. Néanmoins, ce problème technique a constitué un frein important à

l'avancée de mon projet. Quasi simultanément, il est apparu impératif de publier l'article décrivant la méthode employée dans mon projet, initiée et développée, je le rappelle, par le précédent thésard. Des expériences complémentaires nous ont été demandées par les reviewers suite à la soumission de l'article dans un journal très bien quotté (fort impact factor). Ainsi, nous avons décidé de réorienter temporairement mon projet afin de réaliser les expériences suggérées (phase 3). Ces expériences pour l'article (mais aussi bien sûr pour mon projet en lui-même) m'ont pris beaucoup de temps puisqu'il y avait toujours le problème dû au manque de support. Il est à noter que dans ce même temps, un post-doc a cherché à reproduire le support à façon, pour palier à la rupture de fourniture et ainsi trouver une solution fiable et pérenne.

Enfin, la résolution du problème de support ne se résolvant pas rapidement, il a été envisagé de réorienter mon sujet vers l'utilisation d'un autre système de mesure d'activité de réparation (phase 4). Cet autre système a été optimisé pendant la période de ma thèse par deux autres post-docs. Ainsi, j'ai pu contourner le problème mais il faut bien reconnaître que les objectifs initiaux ont dû être remaniés à plusieurs reprises.

Du fait de la disponibilité de ma directrice de thèse, des réunions ont été improvisées aussi souvent que cela était nécessaire à l'avancement, à la résolution de problèmes techniques... Tous les 6 mois, j'essayais de présenter un bilan de l'état d'avancement et de ce qu'il restait à faire. Des réunions plus formelles avec l'équipe réparation ont été organisées environ tous les 3 mois, pour discuter de l'avancement et des problèmes de chacun, et pour communiquer des aspects de management, de programmation des expériences, gestion des stocks.

J'ai pu également communiquer mes résultats lors de réunions avec le LAN (environ 2 par an), ainsi que lors de congrès. J'ai eu la chance de participer à 4 congrès : trois présentations de poster (*3R*, Presqu'île de Giens, Juin 2007, *CLARA*, Lyon, Mars 2008, *International Investigative Dermatology*, Kyoto, Mai 2008) et une conférence orale (*DNA repair, Damage signaling and Carcinogenesis*, Toulouse, Septembre 2007).

J'ai passé quelques jours dans les deux laboratoires collaborateur afin de rencontrer les équipes, et pour apprendre les techniques de culture cellulaire. A la fin de la première année de thèse, j'ai envoyé un rapport dressant les conclusions et les perspectives de mon travail. Les collaborations ont été fructueuses, j'ai pu dialoguer assez facilement avec les deux laboratoires lorsque j'avais des interrogations.

2.3. Evaluation et prise en charge du coût du projet

J'ai choisi de classer les dépenses liées à ma thèse suivant 3 catégories différentes : les dépenses liées aux expériences, les dépenses de missions et de formation et enfin les frais de personnel et d'infrastructure (Figure 4).

matériel expérimental	
Culture cellulaire	11 119 €
Expérience sur biopuce	23 814 €
Matériel divers	710 €
total	35 643 €
Missions et formations	
Missions	2 850 €
Formations	1 635 €
total	4 485 €
Frais de personnel et d'infrastructure	
Thèse CFR	101 657 €
3 Stagiaires	6 416 €
Post-Doc (7% de son temps mensuel pendant 20 mois)	4 789 €
Post-Doc (7% de son temps mensuel pendant 12 mois)	2 874 €
Post-Doc (7% de son temps mensuel pendant 12 mois)	2 874 €
Ingénieur (7% de son temps mensuel pendant 18 mois)	3 316 €
Technicien (7% de son temps mensuel)	6 041 €
Technicien (2 mois à temps plein)	7 216 €
Chercheur CEA (10% de son temps mensuel)	21 009 €
<i>Coût Infrastructure</i>	72 253 €
total	228 444 €
TOTAL coût de ma thèse	268 572 €

Figure 4: tableau récapitulatif des coûts de mon projet

Les dépenses liées à la culture cellulaire comprennent l'achat de cellules, le coût des réactifs et des milieux de culture, le coût en matériel, ainsi que la maintenance et l'approvisionnement en CO₂, gaz indispensable au développement des cellules dans l'incubateur. Les incubateurs et la hotte étaient déjà amortis à mon arrivée. Les dépenses liées aux expériences sur biopuce tiennent compte de l'amortissement du robot de dispense et celui du scanner, mais aussi de la fourniture du matériel pour réaliser les expériences (lames, caches, buses). Cette partie expérimentale de ma thèse représente un coût assez important car elle fait appel à une technologie de pointe.

Les dépenses liées aux missions (France et étranger) et aux formations (anglais, « valoriser sa thèse ») ne représentent pas une part importante du budget.

Enfin, la répartition des dépenses (figure 5) montre nettement que la grande partie du budget est représentée par le personnel et les infrastructures. Les frais de personnel sont calculés sur la base du salaire brute pondéré par le nombre d'heures travaillées sur mon projet par la personne en question. Les charges patronales (40%) sont ajoutées afin d'obtenir le coût final en frais de personnel. Ainsi, j'ai estimé le temps de travail pour chacune des personnes qui ont gravité autour de mon projet : 2 techniciens, 3 post-doc, 1 ingénieur, 3 stagiaires, 1 chercheur et mon salaire (bourse « Contrat de Formation par la Recherche » du CEA). Il ne faut pas oublier le coût en infrastructure calculé pour chaque personne en appliquant un pourcentage (fixé par le CEA) au salaire brut. Ce pourcentage (61.99% pour un employé non-permanent et 63.72% pour un employé permanent) comprend les dépenses liées à l'entretien du bâtiment, chauffage, électricité mais aussi les dépenses liées à la gestion administrative (comptabilité, secrétariat...) et celles inhérentes à la sécurité.

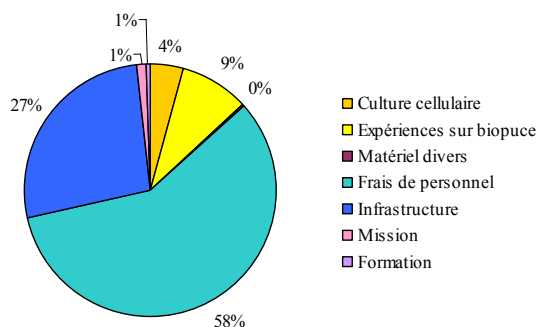


Figure 5: Répartition des coûts liés au projet

Mon projet a été financé en grande partie par le CEA lui-même (figure 6). Les dépenses de personnel et d'infrastructure relatifs à mon projet ont été financées à 96% par le CEA, une des post-doc est financée par le ministère de la Recherche et l'ingénieur est financé via un contrat européen (STREP : projet de recherche spécifique ciblé). Pour les expériences, les dépenses sont partagées entre le CEA, Jonhson & Jonhson (expériences sur biopuce) et GRAVIT (culture cellulaire et expériences sur biopuce). GRAVIT est un consortium d'acteurs de la recherche et de la valorisation. Il est piloté par 3 organismes nationaux (CEA, INRIA et CNRS) et 4 universités (Grenoble, Valence, Chambéry et Annecy).

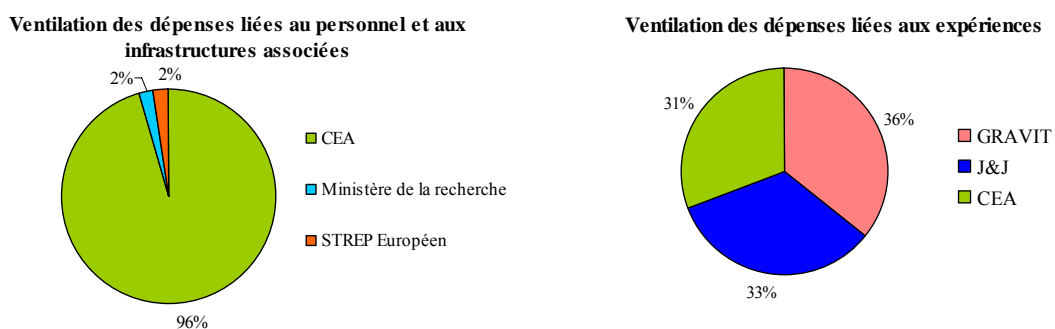


Figure 6: Ventilation des coûts du projet

3. Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

3.1. Compétences directes

Lors de ces trois années, j'ai pu acquérir de nombreuses connaissances scientifiques sur le thème de la réparation de l'ADN, ses mécanismes et les pathologies associées à une déficience. De façon plus large, du fait de la pluridisciplinarité des activités du laboratoire et par le biais des séminaires (intra-LAN ou extérieur), je suis sensibilisée à la chimie de l'ADN et je comprends les méthodes d'analyses chimiques des lésions de l'ADN (HPLC et spectromètre de masse). J'ai pu suivre également le travail de certains de mes collaborateurs pour la réalisation du test « Comète » et pour la mise en culture de fibroblastes cutanés à partir de biopsie de peau.

Mon projet de thèse est basé sur une approche expérimentale. Ainsi, j'ai pu acquérir plusieurs compétences techniques qui étaient nouvelles pour moi au début de ma thèse. Au terme de ces trois ans, je peux affirmer être compétente, avec un bon niveau d'expertise, pour la culture de cellules humaines (plusieurs modèles cellulaires), l'extraction et le dosage de protéines, la mise en place et l'analyse d'une réaction de réparation sur biopuce, l'analyse du

cycle cellulaire par cytométrie en flux. J'ai ainsi pu compléter mes connaissances en microbiologie et biologie moléculaire, acquises au cours de ma formation universitaire et ingénieur par des compétences solides en biologie cellulaire et biochimie.

3.2. Compétences transversales

Au-delà des compétences scientifiques directement liées au sujet de thèse, j'ai pu développer de nombreuses compétences transversales très enrichissantes. Tout d'abord, mon projet de thèse m'a demandé d'analyser des jeux de données obtenues après les expériences sur biopuce. Ce type d'expériences fournit de nombreuses données chiffrées qu'il faut ensuite traiter et interpréter pour leur donner un sens biologique. Pour cela, je me suis appuyée sur la littérature. La réparation de l'ADN est un domaine complexe et très vaste. Tout au long de ma thèse, j'ai donc pris le temps de m'informer (plus de 200 publications analysées). A mi-parcours, j'ai rédigé une synthèse bibliographique pour faire le point et pouvoir confronter mes résultats aux données de la littérature. Je me suis heurtée à une bibliographie assez controversée mais j'ai réussi à analyser les différents points de vue et à les synthétiser. Ainsi, durant ces trois années de thèse, j'ai pu développer des facultés d'investigations, d'analyse et de synthèse.

La lecture de nombreux articles scientifiques m'a permis d'améliorer mes facultés de compréhension de l'anglais écrit. Je suis désormais capable de déchiffrer rapidement le message important d'un texte en anglais et de comprendre une conférence scientifique en anglais. D'autre part, j'ai pu aussi améliorer mon anglais à l'oral en réalisant une conférence lors d'un congrès (*DNA repair, Damage signaling and Carcinogenesis*, Toulouse, Septembre 2007). J'ai aussi pratiqué l'anglais lors du congrès de dermatologie (*IID*, Kyoto, Mai 2008) pour présenter mon poster et interagir avec les autres chercheurs. J'ai pu également présenter mes travaux à l'oral (en français) lors de séminaires intra-LAN et dans un autre laboratoire du CEA. J'ai ainsi pu m'améliorer dans l'aisance, la clarté et la persuasion que requiert cet exercice.

Tout au long de ma thèse, j'ai essayé d'organiser mon travail de façon rationnelle. Comme je l'ai déjà dit, mon projet reposant sur de nombreuses expériences, il a fallu que je les planifie de façon à optimiser mon temps. Ainsi, lorsque j'avais des grosses séries d'échantillons à préparer, j'ai organisé les expériences parfois sur plusieurs semaines suivant un emploi du temps très détaillé (heure par heure). Mon projet de thèse a été jalonné par d'importants problèmes techniques (rupture de fourniture des lames). J'ai donc appris à gérer l'organisation de mon projet en tenant compte de ces aléas.

J'ai eu la chance d'encadrer trois stagiaires au cours de ma thèse : deux étudiantes en formation « technicien de laboratoire » et un étudiant en IUT « Statistique et traitement informatiques des données ». Ces trois expériences d'encadrement m'ont demandé de la pédagogie et d'être à l'écoute de leurs questions et incompréhensions par rapport au sujet. Avant leur arrivée, j'ai conçu un sujet de stage en tenant compte du temps imparti. Je me suis appliquée à les former aux différentes techniques expérimentales, j'ai supervisé leur travail (organisation du temps, choix stratégique), et enfin j'ai corrigé leur rapport de stage. Ces trois encadrements de stage constituent pour moi une expérience très enrichissante de management et de travail en équipe.

Enfin, tout au long de ma thèse, j'ai eu à utiliser les outils informatiques classiques (bureautique, Internet) mais aussi des logiciels d'analyse (GenePix, CellQuestTM). D'autre part, j'ai géré le stock de mes produits et passé les commandes pour les réactifs que j'utilisais (demande de devis, formulaire de demande d'achat, réception de la commande). Chaque année, j'ai dû rédiger un rapport d'activité destiné au CEA.

3.3. Qualités personnelles

Mon projet de thèse m'a demandé une grande patience et de la ténacité. En effet, les thématiques de biologie sont souvent lentes à démarrer du fait de l'utilisation de matériel vivant et les résultats tardent parfois à venir... De plus, j'ai été persévérante face au problème de rupture de support qui a entraîné un retard non négligeable dans l'avancement du projet. J'ai néanmoins fait preuve de réactivité et de capacité d'adaptation rapide. Pour faire face aux différents problèmes rencontrés, il a fallu réorienter le sujet et s'adapter à un nouveau support.

Autant que possible, j'ai abordé mon projet avec rigueur. Lors des expériences, la démarche doit être rigoureuse pour négliger au maximum le facteur « expérimentateur » dans la variabilité des résultats biologiques. De plus, mon projet suivant une démarche exploratoire, il a fallu le gérer de façon rigoureuse pour garder une stratégie cohérente.

Je me suis bien intégrée à l'ensemble de l'équipe du LAN ; de bonnes relations de travail ont permis de coopérer de façon efficace et constructive. De plus, j'ai contribué à la vie du laboratoire en m'investissant dans les tâches collectives. Lors de l'encadrement des stagiaires, j'ai su être pédagogue et j'ai réussi à être autonome dans le management du stage et du stagiaire.

Enfin, au-delà de ma thèse, j'ai souhaité m'investir dans la vie associative d'AITAP (association des doctorants du CEA Grenoble) en faisant partie du bureau (secrétaire). Cela constituait pour moi une opportunité d'aller au contact de nouvelles personnes, et de participer à l'organisation de manifestations dédiées aux doctorants (conférences, simulation d'entretien d'embauche, visite d'entreprises, week-end d'accueil...).

3.4. Construction réseau personnel et professionnel

Tout au long de ma thèse, j'ai pu tisser des liens avec les membres du LAN. Les relations de travail ont été enrichissantes et je pense que le contact sera facile à garder et à entretenir quand j'aurais franchi les murs du CEA. Le congrès de dermatologie (Kyoto, 2008) a été l'occasion de rencontrer des personnes de LVMH et Johnson & Johnson. Lors des « sessions posters », j'ai pu dialoguer avec des chercheurs du domaine de la réparation de l'ADN. Ces discussions déboucheront peut-être sur des collaborations futures avec le LAN.

Un des leitmotiv des ces trois années a été le tissage de relations extérieures au laboratoire et au monde de la recherche en général. Dès le début de ma thèse, j'ai été sensibilisée à l'importance de bien construire mon projet professionnel et à la nécessité de s'y prendre à l'avance. Ainsi, j'ai fait le choix de consacrer une partie de mon temps à rencontrer des personnes extérieures (rencontre réseau avec des personnes d'Alcimed, l'INPI, l'AFNOR...) et à participer à des actions « extra-thèse ». Comme je l'ai dit auparavant, je me suis donc investie dans la vie associative d'AITAP mais j'ai aussi été membre du comité d'organisation de BIOTechno (en 2007 et 2008). BIOTechno est une association nationale qui organise des forums dans plusieurs villes de France (notamment Grenoble et Lyon) afin de regrouper jeunes chercheurs et entreprises de Biotechnologie lors d'une journée de conférences et d'ateliers de discussion. Ce colloque, organisé conjointement avec les doctorants de Lyon, réunit plus de 200 participants pour un budget d'environ 25 000€. L'organisation de cet événement nécessite donc la recherche de fonds. Dans ce cadre, j'ai démarché (par mail et téléphone) une dizaine d'entreprises pour leur présenter le forum et leur proposer un partenariat. Cette activité m'a permis de rentrer en contact avec des acteurs du monde des biotechnologies et des fonctions transversales comme le conseil ou la propriété industrielle et je pourrais m'appuyer sur ce réseau après ma thèse.

3.5. Transférabilité de mes compétences

Les compétences et qualités personnelles développées pendant la thèse peuvent être transférées vers des métiers reliés plus ou moins directement au monde de la recherche

(Figure 7). Des compétences sont communes (rond central) à plusieurs métiers sélectionnés ci-dessous. Les différents rectangles regroupent les métiers pour lesquels une de mes compétences ou qualités est particulièrement recherchée.

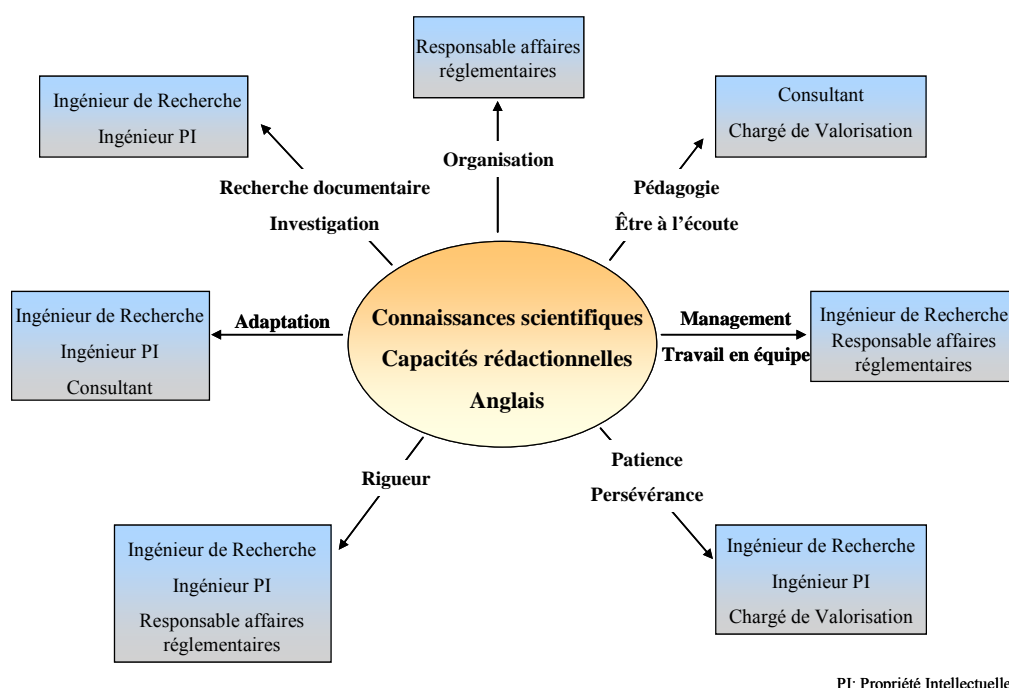


Figure 7: Transfert de mes compétences et qualités personnelles vers une sélection de métiers

4. Résultats et impact de la thèse

Mon projet de thèse valide le concept de « biopuce réparation » par l'utilisation d'échantillons déficients pour la réparation (enfants de la lune). La biopuce est désormais opérationnelle ce qui ouvre la porte à de nombreuses applications intéressantes. Les résultats obtenus sont satisfaisants et les objectifs ont pu être remplis malgré les soucis techniques évoqués auparavant. Ma thèse aura permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes fondamentaux de la réparation de l'ADN. De plus, mon projet pourrait permettre d'améliorer le diagnostic de la maladie XP en proposant une cartographie de la réparation des différents groupes de la maladie.

Pour le LAN, mon projet s'inscrit dans la thématique « biotechnologie » ; les résultats obtenus peuvent faire émerger des hypothèses intéressantes à tester avec les outils de chimie analytique du laboratoire (extension à la thématique « chimie » du LAN).

Pour la communauté scientifique du « monde de la réparation », mon projet permet d'aborder la complexité des mécanismes mis en cause, sous un angle nouveau. En effet, même si mes résultats vont parfois à l'encontre des théories établies dans la littérature, ceux-ci ouvrent de nouvelles pistes intéressantes à explorer.

D'un point de vue sociétal, mon projet de thèse a des retombées en santé publique. La réparation de l'ADN est un mécanisme essentiel à la vie sur Terre. Il est donc primordial de comprendre comment les organismes répondent aux différents stress de l'environnement (UV, fumée de cigarette, pollution atmosphérique...). Le test, développé au LAN et donc validé par les résultats de ma thèse, permet une puissante approche multiparamétrique pour étudier la complexité des mécanismes mis en jeu lors de la réparation de l'ADN. Cet outil peut être utilisé dans plusieurs applications comme le criblage de molécules stimulantes ou inhibitrices

de la réparation de l'ADN, l'effet du vieillissement sur la réparation, le ciblage thérapeutique dans le traitement du cancer... Le cancer est une des principales causes de mortalité chez l'Homme ; il apparaît essentiel de pouvoir offrir aux patients le meilleur traitement. Un traitement personnalisé en fonction notamment des capacités de réparation de l'ADN propre au patient pourrait permettre d'améliorer l'efficacité du traitement. Les conséquences économiques qui en découlent ne sont évidemment pas négligeables.

De mon côté, j'ai pu travailler sur une thématique de biologie humaine très intéressante intellectuellement. Ces trois années de thèse m'auront fait évoluer aussi bien sur le plan personnel (prise de confiance en soi, travail en équipe...) que sur la réflexion par rapport à l'après thèse. Au terme de cette expérience, je souhaite m'orienter vers le secteur privé, vers une thématique appliquée. Dans l'immédiat, je souhaiterais donc plutôt travailler en R&D dans une entreprise de santé ou de biotechnologie. Mon coeur balance encore aussi vers un métier plus transversal entre le monde de la recherche et les fonctions « support ». Ainsi, je suis prête (plus ou moins rapidement suivant les opportunités d'embauche) à m'éloigner de la recherche à proprement parler pour aller vers les métiers de chargé de valorisation, ingénieur brevet ou vers les affaires réglementaires. Ce qui me plaît dans ce type de métiers c'est la pluridisciplinarité liée aux dossiers abordés, le renouvellement permanent des thématiques traitées, le travail en équipe, la part importante du relationnel, sans oublier le lien avec la science.

Pour finir, ma thèse a donc été une expérience professionnelle très enrichissante. Ces trois années, n'ont pas toujours été roses, mais une thèse est une expérience unique qui se vit à 100% où il faut donc jongler entre les aléas parfois très handicapants et la satisfaction d'un travail accompli.

Communications

- **7^{ème} colloque des 3 R** (Réplication, Recombinaison, Réparation), Presqu'île de Giens, du 28 au 31 Mai 2007 : **Poster**, Caractérisation de profils de réparation sur biopuce excision-resynthèse : étude à partir de lignées HeLa exprimant un vecteur pEBVsiRNA ou de fibroblastes de patients atteints de xeroderma pigmentosum.
- **DNA Repair Damage Signaling and Carcinogenesis**, Toulouse, du 15 au 19 Septembre 2007: **Communication orale**, Characterization of DNA repair phenotypes on excision-synthesis biochip : study from xeroderma pigmentosum fibroblasts.
- **3^{èmes} journées scientifiques du CLARA**, Lyon, du 18 au 19 Mars 2008 : **Poster**, Caractérisation de phénotypes de réparation de l'ADN de lignées déficientes à partir d'un test *in vitro* miniaturisé.
- **International Investigative Dermatology 2008**, Kyoto, du 14 au 17 Mai 2008 : **Poster**, Characterization of DNA repair phenotypes from different repair-deficient cell lines with an *in vitro* miniaturized test.
- **8th Winter Research Conferences Oxidative DNA damage : From chemical aspects to biological consequences**, Les Houches, du 17 au 23 Janvier 2009 : **Poster**, Characterization of DNA repair phenotypes from XPA and XPC cell lines with an *in vitro* miniaturized test.

RESUME

L'ADN subit en permanence des agressions modifiant l'information pour laquelle il code. Plusieurs mécanismes, dont la réparation par excision de bases (BER) et la réparation par excision de nucléotides (NER), permettent à la cellule de restaurer la séquence de l'ADN. Le Xeroderma pigmentosum est une maladie caractérisée par une déficience pour la réparation par la voie NER. L'objectif de ce travail était de proposer un test fiable et rapide pour le diagnostic de cette maladie comme alternative au test existant, l'UDS. Les activités de réparation de l'ADN de lignées XP ont été quantifiées à l'aide de tests *in vitro* miniaturisés et multiparamétriques afin d'établir les phénotypes de réparation de l'ADN de cellules déficientes pour la protéine XPA ou XPC. L'avantage des tests utilisés dans cette étude réside dans la mesure conjointe soit de l'excision soit de l'excision-resynthèse (ER) de plusieurs lésions à partir d'un seul lysat cellulaire.

Nous montrons que l'importance relative de l'ES des différentes lésions dépend fortement de la concentration protéique du lysat nucléaire testé. Ainsi, lorsque la concentration protéique augmente, il devient possible de discriminer le phénotype XP du phénotype témoin, ce qui est impossible en dessous d'une concentration seuil. D'autre part, alors que l'irradiation des cellules témoins aux UVB stimule leurs activités de réparation, cet effet n'est pas observé pour les cellules XP.

Cette étude apporte donc de nouvelles informations quant aux rôles des protéines XPA et XPC lors des mécanismes de réparation BER et NER et souligne la complexité des régulations mises en jeu.

Mots clés : Réparation de l'ADN, Xeroderma pigmentosum, test *in vitro*.

ABSTRACT

DNA is constantly damaged modifying the genetic information for which it encodes. Several cellular mechanisms as the Base Excision Repair (BER) and the Nucleotide Excision Repair (NER) allow recovering the right DNA sequence. The Xeroderma pigmentosum is a disease characterised by a deficiency in the NER pathway. The aim of this study was to propose an efficient and fast test for the diagnosis of this disease as an alternative to the currently available UDS test. DNA repair activities of XP cell lines were quantified using *in vitro* miniaturized and parallelized tests in order to establish DNA repair phenotypes of XPA and XPC deficient cells. The main advantage of the tests used in this study is the simultaneous measurement of excision or excision synthesis (ES) of several lesions by only one cellular extract.

We showed on one hand that the relative ES of the different lesions depend strongly on the protein concentration of the nuclear extract tested. Working at high protein concentration allowed discriminating the XP phenotype versus the control one, whereas it was impossible under a certain concentration's threshold. On the other hand, while the UVB irradiation of control cells stimulated their repair activities, this effect was not observed in XP cells.

This study brings new information on the XPA and XPC protein roles during BER and NER and underlines the complexity of the regulations of DNA repair processes.

Key words : DNA repair, Xeroderma pigmentosum, *in vitro* repair tests.